



Contribution à une approche intégrée pour la prévention de la flavobactériose dans les élevages de truites arc-en-ciel

Alexandra Gasteau

► To cite this version:

Alexandra Gasteau. Contribution à une approche intégrée pour la prévention de la flavobactériose dans les élevages de truites arc-en-ciel. Biodiversité et Ecologie. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0312 . tel-01285778

HAL Id: tel-01285778

<https://theses.hal.science/tel-01285778>

Submitted on 9 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS
SPÉCIALITÉ Biogéochimie et écosystèmes

Par Alexandra GRASTEAU

**Contribution à une approche intégrée pour la prévention de
la flavobactériose dans les élevages de truites arc-en-ciel.**

Sous la direction de : Michel LE HENAFF

Soutenue le 16 Décembre 2015

Membres du jury :

M. GARABETIAN, Frédéric, PR
Mme MICHOTEY, Valérie, PR
Mme OCCHIALINI-CANTET, Alessandra, MC-HDR
M. GATESOUBE, Joël, IR-HDR
M. REY, Patrice, PR
M. LE HENAFF, Michel, MC-HDR

Université de Bordeaux
Université d'Aix Marseille
Université de Montpellier
INRA - Ifremer de Brest
Bordeaux Sciences Agro
Bordeaux Sciences Agro

Président
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur

Avant Propos

La présente thèse a été financièrement soutenue par la région Aquitaine, le CIPA (Comité Interprofessionnel des Produits de l'Aquaculture), et le GDSAA (Groupement de Défense Sanitaire Aquacole Aquitaine). Ces travaux ont été réalisés dans le cadre d'un partenariat technique et scientifique avec Bordeaux Sciences Agro, le LPL (Laboratoire Départemental des Pyrénées et des Landes) et les pisciculteurs qui participent à l'étude, sur des sites localisés dans le Sud-Ouest, afin de bénéficier des conditions de l'expérimentation terrain. L'ensemble de ces études a fait l'objet d'une soumission d'articles scientifiques, de communications orales et écrites, dont le détail est présenté ci-après.

Publication

Grasteau A, Guiraud T, Daniel P, Calvez S, Chesneau V, and Le Hénaff M. Journal Aquaculture Research and Development. **Evaluation of glutaraldehyde, chloramine T, bronopol, Incimaxx Aquatic® and Hydrogen Peroxide as Biocides against *Flavobacterium psychrophilum* for Sanitization of Rainbow Trout Eyed Eggs (2015).**

Grasteau A, Guiraud T, Daniel P, Chesneau V and Le Hénaff M. **New qPCR for detection and quantification of *Flavobacterium psychrophilum* infecting rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (en preparation).**

Communication orale

4^{èmes} Journées Recherche Filière Piscicole, Paris (2014): Grasteau A, Guiraud T, Chesneau V, Daniel P et **Le Hénaff M***. Nouvelle approche qPCR dans la détection de l'infection des truites arc-en-ciel par *Flavobacterium psychrophilum* (Communication orale par *).

IX^{ème} Congrès de la Société Française de Microbiologie, Lille 2013 : **Grasteau A***, Guiraud T, Daniel P, Chesneau V, Papillon S and Le Hénaff M. Effets bactériostatiques et bactéricides de désinfectants sur *Flavobacterium psychrophilum*.

Communication affichée

III^{ème} Journées de la Recherche Filière Piscicole Paris, 2012 : **Grasteau A**, Ipas B, Daniel P, Douet D-G, Chesneau V and Le Hénaff M. Approche intégrée pour la prévention de la flavobactériose des poissons d'élevage.

***A ma famille,
A tous ceux qui me sont chers***

***"Everybody is a genius. But if you judge a fish by its ability to climb a tree, it will live its whole life believing
that it is stupid." Albert Einstein***

***"Le poisson rouge ne peut ramener la complexité des océans à la quiétude de son bocal."
Mohammed Moulessehoul, dit Yasmina Khadra***

REMERCIEMENTS

Avant tout, je dédie ce travail à mes parents, Patricia et Pierre et à mon frère, Fabien. Vos sacrifices et votre présence à tout moment m'ont permis d'être là où j'en suis. Vous êtes, pour moi, un exemple à beaucoup de points de vue. La pudeur empêche parfois d'exprimer facilement ses sentiments, que cette thèse soit enfin un témoignage de ma gratitude et de mon amour.

Ce manuscrit marque la fin de mes quatre années de thèse passées au sein de Bordeaux Sciences Agro. Ainsi, je tiens à exprimer toute ma gratitude aux nombreuses personnes qui ont rendu ce projet possible. Mes remerciements vont en tout premier lieu à Monsieur Antoine Grémare, directeur de l'UMR EPOC et à Monsieur Olivier Lavialle pour m'avoir accueilli au sein de son école « Bordeaux Science Agro ». A Michel Le Hénaff pour avoir accepté de diriger mes travaux de thèse. Des remerciements vont également aux membres du comité de ma thèse, pour leur participation à ce jury et qui ont accepté de juger ce travail.

J'offre également mes remerciements à tous ceux qui se sont frottés aux « Flavobactéries » Marc Lamothe, Xavier Harispe, Valérie Chesneau, Patrick Daniel, Mélanie Lesne et Diane-Gaëlle Douet, pour leur dévouement et pour nos échanges qui ont contribué au développement du projet. À tous les pisciculteurs qui ont participé à l'élaboration des expérimentations terrains et pour leur implication, un grand merci à Vincent Petit, Jean-Yves et Jérôme ainsi qu'à Vincent Daubigné, David, Carlos et Enzo. À Monsieur Marc de L'Hermite mais surtout Sébastien et l'équipe de Lévigacq. À la pisciculture Bellet de Touvre, en particulier François Marchand pour son implication. Mais je tiens également à remercier toutes les autres piscicultures pour nous avoir ouvert leur porte, un grand merci c'est grâce à vous que ce projet a pu aboutir.

Un merci à tous mes collègues du laboratoire PCR Valérie, Mylène et Sandrine ainsi que les stagiaires qui ont travaillé sur le projet notamment Cécile, Hélène (14,6 !!!). Une pensée pour mes camarades de bureau : Simon, Bastien et Thomas, merci pour vos précieux conseils et pour votre aide sur le projet. Un grand merci à l'ensemble du personnel de Bordeaux Science Agro et en particulier à tous les acteurs de la salle café (thé) du bâtiment MÉDOC et ceux du bâtiment POMEROL qui vont me rester également en mémoire.

*Il y avait une vie après le laboratoire. Je remercie mes plus fidèles amis sarthois, Élodie, Cécile, Cyril, Julie, Amandine Brice, (Calistine et Cléopée) (et nos élèves les terminales ST2S ☺ promo 2015), Marie, Arnaud (Louise et Jeanne), Élodie, Julien (Juliette et Agathe) pour les moments partagés en dehors de la thèse, pour leur amitié depuis de nombreuses années. Mais aussi à mes amis bordelais, Nancy, Florian, Dr Silvia Racedo et Helmut (Good Wedding in Austria), les deux Romains, Med, Stéphanie, Maïté, Malika, Julie (trompette), Mimi, Tom Frager, Adrian, Louisa et Julien, Laura, Lionel, Luc, Lili et Diego (Rafael), Thibault (Elliot), Mélanie et Matthieu (Léopol), un grand merci, à tous pour toutes les soirées que l'on a passées ensemble et d'avoir été là dans les bons comme dans les mauvais moments. Je vous souhaite plein de bonnes choses pour la suite. Même si nous ne suivons pas les mêmes chemins, il y a fort à parier que nous serons proches aux grands carrefours de la vie à venir... **A vous tous, je dirai tout simplement : UN GRAND MERCI.***

TABLES DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE	p. 1
CHAPITRE I DE L'AQUACULTURE À LA TRUITICULTURE ET DE LA MALADIE À L'HÔTE <i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i>	
I. L'AQUACULTURE DANS SON CONTEXTE	
1. Historique	p. 3
2. Le cheptel piscicole français	p. 4
3. Répartition de l'activité piscicole sur le territoire métropolitain	p. 5
II. LA TRUITICULTURE	
1. Gestion de la reproduction de la truite	p. 6
2. Mode de conduite et les animaux produits	p. 8
3. Gestion des maladies	p. 10
4. Bien-être animal	p. 10
5. Questions environnementales	p. 11
III. L'HÔTE, LA TRUITE ARC EN CIEL (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	
1. Historique et répartition géographique	p. 12
2. Caractéristiques et morphologie générale	p. 13
3. Système de défense de la truite	p. 13
IV. L'AGENT ÉTIOLOGIQUE DE LA FLAVOBACTÉRIOSE : <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	
1. Classifications taxonomiques et phylogéniques	p. 16
2. Caractéristiques phénotypiques	p. 17
3. Épidémiologie de la flavobactérie et signes cliniques	p. 18
4. Les facteurs influençant l'apparition de la flavobactérie, l'âge et la température	p. 19
5. Les facteurs de virulence de <i>F. psychrophilum</i>	p. 19
6. Le processus infectieux	p. 21
V. MOYENS DE LUTTE CONTRE LA FLAVOBACTÉRIOSE	
1. La sélection génétique de truites résistantes à <i>F. psychrophilum</i>	p. 21
2. Impacts environnementaux sur la flavobactérie	p. 23
3. Traitement et prophylaxie	p. 24
4. Diagnostic de la flavobactérie et détection de <i>F. psychrophilum</i>	p. 26
5. Les traitements thérapeutiques par antibiothérapie	p. 26
6. La vaccination	p. 27
VI. OBJECTIFS DE RECHERCHE	p. 30
CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES	
I. TECHNIQUES PRÉPARATIVES	
1. Bactéries : souches et conditions de culture	p. 32
2. <i>Escherichia coli</i> : souches et conditions de culture	p. 32
3. Vecteur de clonage	p. 32

4. Site expérimental piscicole	p. 33
5. Extraction des acides nucléiques	p. 33
6. Amplification génique par PCR	p. 34
7. Clonage moléculaire	p. 34

II. TECHNIQUES ANALYTIQUES

1. Analyse RT-QPCR en temps réel, quantification de <i>F. psychrophilum</i>	p. 35
2. Comparaisons et sélection des amorces	p. 35
3. Normalisation des données	p. 36
4. Caractérisation phénotypique des souches (Formation de biofilms)	p. 37
5. Dosage des protéines	p. 38
6. Séparation monodimensionnelle des protéines par électrophorèse en présence de SDS	p. 38
7. Détection des protéines par immunoempreinte (Western Blot)	p. 39
8. Analyse PFGE	p. 40
9. Analyse MALDI-TOF	p. 44

III. EXPRESSION DES RÉSULTATS ET TRAITEMENTS STATISTIQUES

CHAPITRE III DÉTECTION ET CARACTÉRISATION PRÉCOCE DE L'INFECTION À *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM* CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL

1. Introduction	p. 47
2. Matériel et Méthodes spécifiques	p. 49
a. Dessin des jeux d'amorces et sondes spécifiques de <i>F. psychrophilum</i> ou de la truite pour le développement d'une qPCR Taqman	p. 49
b. Tests de spécificité des amorces et de la sonde Flapsy_16S	p. 50
c. Mise au point de la qPCR TaqMan en duplex <i>adnr16S</i> de <i>F. psychrophilum</i> / β -actine de la truite	p. 51
d. Détermination des limites de quantification	p. 51
3. Résultats et discussion	p. 52
a. Validation des amorces et des sondes pour la qPCR TaqMan duplex <i>adnr16S</i> de <i>F. psychrophilum</i> / β -actine de truite arc-en-ciel	p. 52
b. Sensibilité du test qPCR TaqMan <i>in vitro</i>	p. 53
c. Sensibilité du test qPCR Taqman <i>in vivo</i>	p. 54
d. Validation de la qPCR TaqMan en duplex sur les isolats terrains de <i>F. psychrophilum</i>	p. 56
e. Application de la qPCR TaqMan en duplex pour le suivi d'un épisode de flavobactériose	p. 57
4. Conclusion	p. 58

CHAPITRE IV LA DESINFECTION DES OEUFs DE TRUITE ARC-EN-CIEL EN MILIEU AQUACOLE

1. Contexte et rappel de l'objectif	p. 62
2. Discussion/conclusion	p. 64

Evaluation of glutaraldehyde, chloramine T, bronopol, Incimaxx Aquatic® and Hydrogen Peroxide as biocides against for *Flavobacterium psychrophilum* for sanitization of rainbow trout eyed eggs (2015). Grasteau A, Guiraud T, Daniel P, Calvez S, Chesneau V and Le Hénaff M. Journal of Aquaculture Research and Development.

CHAPITRE V RECHERCHE D'UN TRAITEMENT PROBIOTIQUE ANTAGONISTE DE *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM*

1. Contexte et rappel de l'objectif	p. 67
2. Protocole expérimental	p. 69
a. Les traitements probiotiques retenus	p. 69
b. Tests d'inhibition de croissance	p. 70
c. Les expérimentations « terrains »	p. 70
d. Préparation et administration des additifs	p. 70
e. Détection du probiotique Bactocell® dans les fèces des poissons	p. 70
f. Détection du probiotique E112® dans les intestins de poissons par PCR	p. 71
3. Résultats et Discussion	p. 72
a. Croissance du Bactocell® et effet antagoniste vis-à-vis de <i>F. psychrophilum</i>	p. 72
b. Mise en oeuvre du Bactocell® sur deux sites aquacoles distincts	p. 72
c. Recherche du probiotique Bactocell® dans les fèces des poissons	p. 74
d. Croissance du cocktail E112® et effet antagoniste vis-à-vis de <i>F. psychrophilum</i>	p. 75
e. Les expérimentations terrains avec le cocktail de probiotique E112®	p. 75
f. Analyse de l'expression chez la truite de gènes de l'immunité et de stress	p. 78
4. Conclusion	p. 79

CHAPITRE VI FAISABILITÉ D'UN VACCIN PROTECTEUR CONTRE LE PATHOGENÈ

1. Introduction	p. 82
2. Matériel et méthodes	p. 84
a. Sélection des souches <i>F. psychrophilum</i> isolées des sites piscicoles aquitains	p. 84
b. Préparation des différentes fractions de <i>F. psychrophilum</i>	p. 84
c. Préparation des cocktails antigéniques	p. 85
d. Essais de vaccination des poissons	p. 85
3. Résultats et discussion	p. 87
a. Identification des protéines « immuno-réactives »	p. 87
b. Analyse des paramètres zootechniques	p. 88
4. Conclusion	p. 89

CHAPITRE VII CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

p 99

ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

AMM : autorisation de mise sur le marché

APS : persulfate d'ammonium

ARN : acide ribonucléique

BCWD : bacterial cold water disease

BSA : sérum albumine bovine

CA : chiffre d'affaire

CMI : concentration minimale inhibitrice

CMB : concentration minimale bactéricide

dNTP : désoxyribonucléotide

DO : densité optique

DOM : département d'outre-mer

DMSO : diméthylsulfoxyde

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (dosage immuno-enzymatique sur support solide)

EMA: Bromure d'éthidium MonoAzide, marqueur de viabilité cellulaire

ERIC : Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (utilisation d'amorces ciblées sur des gènes présents de manière répétitive sur le chromosome)

FAO : Food and Agriculture Organization

FLP : milieu liquide ou solide *F. psychrophilum*

GBPS : Guide des Bonnes Pratiques Sanitaire

GDSAA : Groupement de Défense Sanitaire Aquacole d'Aquitaine

HEPES : acide (2-hydroxy-4-éthyl-1 piperaziny)-2-éthanesulfonique

kb : kilobases

kDa : kilodaltons

LPL : Laboratoire Départemental des Pyrénées et des Landes

LPS : lipopolysaccharide

MLST : MultiLocus Sequence Typing (typage par séquençage de plusieurs loci codant pour des gènes de ménage)

MLVA : MultiLocus VNTR Analysis (analyse de plusieurs loci VNTR)

MM : masse moléculaire

NCC : cellules cytotoxiques non spécifique

NK : natural killer

OMPs : protéines de la membrane externe

PAT : protéines animales transformées

PBS : phosphate buffer saline

PFGE : Pulse Field Gel Electrophoresis (électrophorèse en champ pulsé de l'ADN par une enzyme de restriction)

PRS : le pourcentage relatif de survie

qPCR : réaction de polymérisation d'ADN quantitative

RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA (amplification aléatoire d'ADN de séquences courtes qui s'hybrident sur le génome)

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (digestion d'ADN génomique par une endonucléase à coupures fréquentes)

rpm : rotation par minute

RTFS : syndrome de l'alevin de truite arc-en-ciel

Sarkosyl : N-Lauryl sarcosinate de sodium

SDS : dodécyl sulfate de sodium

SDS-PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

SPPA : Syndicat Professionnel des Producteurs d'Aliments Aquacoles

TAC : truite arc-en-ciel

TCA : taux de croissance annuel

Tris : Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane

Tween 20 : monolaurate de polyoxyéthylène sorbitane

VNTR : Variable Number of Tandem Repeat (nombre variable de copies d'une séquence répétée selon les souches et les loci)

UE : union européenne

UV : ultra-violet

INTRODUCTION GÉNÉRALE

En Europe, comme en France, la production piscicole a doublé en dix ans pour atteindre dans certains cas le stade industriel. L'aquaculture d'eau douce française produit essentiellement des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss* ; environ 36.000 tonnes/an). L'intensification de l'aquaculture s'est accompagnée d'un développement de différentes maladies, (i) non-infectieuses liées aux conditions environnementales, nutritionnelles et génétiques de l'élevage, mais également (ii) infectieuses, liées aux développements d'agents pathogènes. Différents bio-agresseurs, seuls ou en association, peuvent infecter les poissons : des parasites (ex. *Gyrodactylus* sp.), des virus (ex. les rhabdovirus SHV et NHI, responsables de la « Septicémie Hémorragique Virale » et de la « Nécrose Hématopoïétique Infectieuse », respectivement) et/ou des bactéries. De nombreuses bactéries ichtyopathogènes ont été décrites (ex. *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*, *Yersinia ruckeri*,...) parmi lesquelles *Flavobacterium psychrophilum*. Cette bactérie retrouvée chez de nombreux poissons d'eau douce d'élevage est l'agent responsable du syndrome de l'alevin de truite arc-en-ciel (= « Rainbow Trout Fry Syndrom » ou RTFS) et de la maladie bactérienne de l'eau froide (= « Bacterial Cold Water Disease » ou BCWD) (Davis 1946). Décrite pour la première fois en 1946 aux Etats-Unis, la BCWD, n'est apparue en France qu'au milieu des années 1980. Les mécanismes de virulence liés à cette bactérie restent encore peu connus. Les pertes économiques induites dans les élevages aquacoles de truites sont considérables dans la mesure où l'infection peut conduire à 70 % de mortalité chez des poissons au stade alevin. Il est donc important de renforcer la mise en œuvre de programmes de prophylaxie préventive qui relèvent de l'application des règles d'hygiène, des procédures de nettoyage et de désinfection, du traitement de l'eau, mais aussi des bonnes pratiques de nourrissage et d'élevage. La prophylaxie médicale est basée sur l'utilisation de vaccins. Néanmoins, il n'existe pas de vaccins commerciaux permettant de protéger les poissons contre les flavobactérioses hivernales et seule l'antibiothérapie permet de limiter les pertes liées aux infections à *F. psychrophilum*. Des contraintes législatives et écologiques en limitent l'utilisation et elle ne peut constituer une fin satisfaisante en soi. De nombreuses recherches actuelles pour contrôler les flavobactérioses s'orientent vers des approches biotechnologiques *via* l'utilisation de bactériophages, (Stenholm et coll., 2008 ; Castillo et coll., 2012 ; Madsen et coll., 2013) ou de flavobactéries atténuées (LaFrentz et coll., 2008). Ces travaux semblent prometteurs pour proposer des traitements à bas coûts, mais présentent des difficultés d'application, en raison de l'interdiction de la dispersion d'organismes vivants dans le milieu naturel.

C'est dans ce contexte que j'ai cherché à identifier et à mettre en place des mesures préventives dans la lutte contre les flavobactérioses hivernales. Le premier chapitre présenté dans ce mémoire est consacré à une description de la littérature relative à l'aquaculture, à *F. psychrophilum* et aux interactions de cette bactérie avec l'hôte « poisson ». Le matériel et les méthodes utilisés au cours de ces travaux sont consignés dans le deuxième chapitre. Les chapitres suivants sont consacrés aux résultats collectés au cours de cette étude : chapitre III, l'identification précoce de l'infection à *F. psychrophilum* des œufs/alevins par une approche moléculaire (qPCR Taqman), qui présente un certain nombre d'avantages dont la rapidité et la spécificité du diagnostic ; chapitre IV, la mise en place de procédures de désinfection efficaces au stade œuf, une étape clé pour limiter la dissémination du pathogène liée à une transmission *ex-ovo* de la maladie ; chapitre V, le rôle de la flore barrière, dont l'effet compétiteur est susceptible de limiter l'installation de microorganismes pathogènes indésirables dont *F. psychrophilum* ; et enfin chapitre VI, l'administration de cocktails vaccinaux à base de souches de *F. psychrophilum* fraîchement isolées et leurs effets protecteurs sur les poissons contre la flavobactériose. Les principales conclusions et les perspectives de recherche du travail réalisé au cours de la thèse sont rassemblées dans le dernier chapitre.

CHAPITRE I

DE L'AQUACULTURE À LA TRUITICULTURE

ET DE LA MALADIE À L'HÔTE *ONCORHYNCHUS MYKISS*

I. L'AQUACULTURE DANS SON CONTEXTE

1. Historique

L'aquaculture est une activité économique majeure pour la plupart des pays dans la mesure où elle représente une alternative crédible à l'industrie traditionnelle de la pêche qui, depuis une dizaine d'années, connaît une diminution liée à la dégradation des ressources disponibles. L'aquaculture vise à produire des organismes aquatiques en eau douce, saumâtre ou marine dans des conditions contrôlées ou semi-contrôlées par l'homme, qu'il s'agisse d'animaux (poissons, crustacés, mollusques, ...) ou de végétaux (algues). L'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (Food and Agriculture Organization, FAO) précise que l'intervention humaine dans le processus d'augmentation de la production (mise en charge régulière, alimentation, protection,...) est nécessaire, mais ajoute une condition de propriété individuelle ou juridique du stock en élevage. Cette définition de l'aquaculture suffisamment large couvre bien les activités piscicoles en mer ou en eaux douces et non les activités de pêche.

Les productions mondiales de poissons ont été évaluées en 2010 à 115 millions de tonnes dont près de 40 millions de tonnes résultant de l'aquaculture (Figure1) (FAO 2012). Depuis les années 50, les productions par élevage augmentent de manière exponentielle : de 4 % en 1980, la part de poissons issus d'élevage atteint près de 35 % en 2010 en raison de la stagnation des captures (< 80 millions de tonnes), du développement et de la densification des élevages ainsi que de la maîtrise de nouvelles espèces.

Dans ce contexte, la production européenne aquacole stagne (Figure 2). Elle est estimée à moins de 5 % des tonnages mondiaux en 2010 (< à 2 millions de tonnes), mais elle est globalement caractérisée par l'élevage d'espèces marines « nobles » qui représentent 11,8 % de la valeur mondiale (près de 7 Md d'€).

Alors que la France dispose de nombreux atouts pour développer son industrie aquacole (plus de 5.500 km de littoral ; des réseaux hydrographiques de 270.000 km), elle n'arrive qu'en 8^{ème} position européenne pour son activité piscicole tant en quantité (= approximativement 47.000 tonnes en 2010 ; 44.258 tonnes en 2012) qu'en valeur (moins de 200 M d'€) (Tableau I). Depuis un certain nombre d'années, la filière piscicole est confrontée à de nombreuses difficultés, certaines spécifiques, d'autres plus générales, liées : (i) à l'accès difficile aux espaces aquatiques (conflits d'usage) ; il n'y a pas eu de création de site d'élevage depuis plus de 25 ans ; (ii) à un déficit d'image des produits de l'aquaculture française ; (iii) à un arsenal thérapeutique relativement faible pour traiter les problèmes

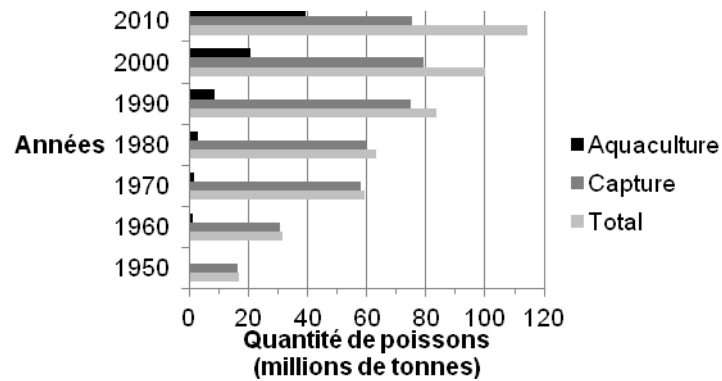


Figure 1. Evolution des productions mondiales de poissons par capture et par aquaculture.
(Données FAO FishstatPlus, 2012).

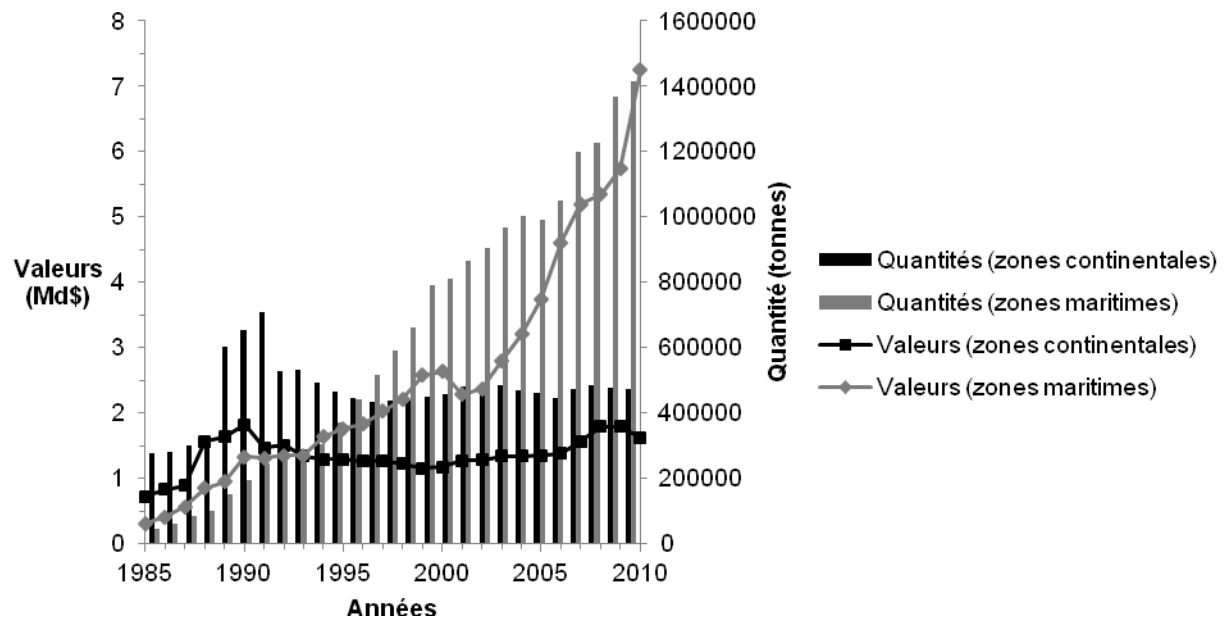


Figure 2. Evolution des productions européennes piscicoles marines et continentales en quantités (tonnes) et en valeurs (Milliard de dollars) en fonction des années.
(Sources, données FAO FishstatPlus, 2012).

sanitaires ; (iv) aux nécessaires, mais de plus en plus sévères, contraintes environnementales (quantité d'eau dérivée et débit réservé, qualité des rejets, restauration de la continuité écologique) ; (v) à une trop grande dépendance vis-à-vis des farines et huiles de poissons dans l'alimentation des poissons d'élevage ; et (vi) à un manque de visibilité dans le développement de la filière au niveau national.

Ces difficultés expliquent en partie la stagnation de la production piscicole française, la baisse de la production continentale, forte dans les années 80-90 avec un taux de croissance annuel (= TCA) de 20 % mais beaucoup plus faible dans les années 2000 (TCA de 1 %), n'est que partiellement compensée par une montée en charge annuelle de la pisciculture marine. Plusieurs types de piscicultures sont pratiqués en France : (i) la salmoniculture d'eau douce (essentiellement la truite arc-en-ciel) ; (ii) la pisciculture d'étang (carpes majoritairement ainsi que gardon, rotangle, tanche, brochet et sandre) ; (iii) la pisciculture de repeuplement [ex. truites fario pour la pêche de loisir, saumon atlantique, esturgeons (*Acipenser sturio*) pour la préservation des espèces] qui a vocation à produire de jeunes poissons, relâchés ensuite dans les espaces aquatiques naturels. D'autres espèces et d'autres techniques d'élevage se développent en France comme par exemple la reproduction artificielle de poissons marins (bar, turbot ou sole), l'utilisation de cages flottantes en mer pour les salmonidés, les essais d'élevage d'anguilles en utilisant les eaux chaudes de refroidissement de certaines centrales électriques ou l'écloserie de poissons d'eau douce (carpe, brochet, ou esturgeon sédentaire).

2. Le cheptel piscicole français

L'activité piscicole française regroupe trois secteurs principaux d'élevage bien distincts : (i) la salmoniculture, (ii) la pisciculture marine et (iii) la pisciculture d'étang et, plus récemment, (iv) l'élevage d'esturgeons (FAO 2012). Elle se caractérise par une très forte production d'espèces d'eau douce. Les différentes espèces de poissons élevés sont répertoriées dans le tableau I.

L'élevage de truites arc-en-ciel est très prépondérant avec une production de 32.000 tonnes (35.152 tonnes en 2009), soit 80 % du tonnage « poissons d'eau douce », pour un chiffre d'affaire (CA) évalué à environ 115 M d'€. La France est le 5^{ème} producteur mondial, le premier étant le Chili avec 220.000 tonnes de poissons élevés. Sur la scène européenne, la France est le 4^{ème} producteur de truites arc-en-ciel mais le second derrière la Norvège (CA de 153 M d'€) en valeur. Les espèces marines (bar, dorade, saumon, maigre, turbot et sole) d'élevage plus récent ne représentent que 5.800 tonnes. La pisciculture d'étang avoisine les

Tableau I.
Recensement des poissons élevés en France en 2010
(Données FAO 2012, FishstatPlus).

Environnement	Désignation	Quantité (tonnes)	Valeur (€)
Eau douce	Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	32 000	114 660 397
	Carpe commune (<i>Cyprinus carpio</i>)	4 200	5 102 213
	Gardon (<i>Rutilus rutilus</i>)	1 900	4 845 040
	Tanche (<i>Tinca tinca</i>)	900	2 186 627
		750	5 919 755
	Poissons d'eau douce nca	500	1 641 599
	Cyprinidés (autres que la carpe commune)	300	551 626
	Esturgeon de Sibérie (<i>Acipenser baerii</i>)	300	2 708 396
	Poisson chat européen (<i>Silurus glanis</i>)	200	656 623
	Autres salmonidés	140	1 257 490
	Sous Total	41 190	139 529 766
Marine	Bar (Loup) européen (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	2 600	19 957 851
	Dorade (Daurade) royale (<i>Sparus aurata</i>)	1 400	9 054 160
	Saumon de l'Atlantique (<i>Salmo salar</i>)	800	3 939 905
	Maigre commun (<i>Argyrosomus regius</i>)	400	2 463 348
	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	400	4 347 026
	Sole du Sénégal (<i>Solea senegalensis</i>)	150	1 630 135
	Autres poissons marins	45	421 060
	Sous Total	5 795	41 813 483
Total		46 985	181 343 250

12.000 tonnes, la plus grande partie de cette production est valorisée à travers le marché du repeuplement (6.760 tonnes/an) mais également le marché de la vente directe (2.570 tonnes/an). Les principales espèces commercialisées sont la carpe (53 %), le gardon (25 %), la tanche (13 %) et les carnassiers (dont le brochet 8 %), le sandre, la perche, le silure et le chevesne (Fontaine, 2009).

Avec 19 tonnes, la production française de caviar d'esturgeon représente 15 % de la production mondiale (19 tonnes sur les 150 tonnes du marché mondial/an). Elle a connu une activité en très forte évolution de +42 % depuis 2004. La production de chair d'esturgeon représente 277 tonnes en 2011 et a connu quant à elle une évolution de +75 %. La moitié de la production de caviar est vendue en France, 21 % en Union Européenne (UE) et 30 % hors UE. L'Aquitaine est la 1^{ère} région de production de caviar d'esturgeon, avec environ 70 % de la production nationale.

Depuis une vingtaine d'années, les départements d'outre-mer (DOM) développent leurs activités piscicoles pour satisfaire à la fois la demande locale, mais également celle de l'UE (Tableau II). Par exemple, Mayotte, a augmenté son cheptel d'espèces marines pour répondre à cette demande.

3. Répartition de l'activité piscicole sur le territoire métropolitain

L'élevage de salmonidés est aujourd'hui résolument tourné vers la truiticulture avec pour principales zones de production l'Aquitaine et la Bretagne, qui assurent environ 47 % de la production nationale. Depuis 1997, les 600 entreprises répertoriées emploient environ 2.000 personnes, réparties sur quelques 800 sites (Figure 3) (Agreste, 2011). La région Aquitaine, 1^{ère} région piscicole de France, a une production de salmonidés estimée à 8.630 tonnes soit 25 % de la production nationale. C'est également le 1^{er} producteur d'œufs de truite du territoire (85 % de la production française ; 50 % de la production européenne) (AFPPE 2012). Apparue au début des années 1970, la pisciculture marine s'est développée à partir des années 80 et affiche une certaine stabilité avec 6.000 tonnes de production pour un chiffre d'affaires de l'ordre de 40 millions d'euros (données 2007). Elle regroupe une cinquantaine d'entreprises réparties sur tout le littoral. Les principales espèces élevées sont le bar, la daurade royale, le saumon et le turbot.

La pisciculture d'étang est conduite en pluriactivité par de nombreux petits exploitants (6.000 environ) mais seuls 75 professionnels à temps plein gèrent près de la moitié des étangs en France métropolitaine. Les surfaces d'étangs exploitées en France métropolitaine

Tableau II.

Recensement des poissons élevés dans les départements d'outre-mer (DOM) en tonnes en 2010

(Sources, données FAO 2012, FishstatPlus).

Environnement	Désignation	Mayotte	Réunion	Martinique	Guadeloupe	Guyane française
Eau douce	Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)		40			
	Tilapias (<i>Oreochromis niloticus</i>)		60	5	1	
	Autres poissons d'eau douce					30
	Sous Total		100	5	1	30
Marine	Tambour rouge (ombrine ocellée, <i>Sciaenops ocellatus</i>)	100	50	45	3	
	Cobia (mafou, <i>Rachycentron canadum</i>)			25		
	Autres poissons marins	50				
	Sous Total	150	50	70	3	0
	Total	150	150	75	4	30

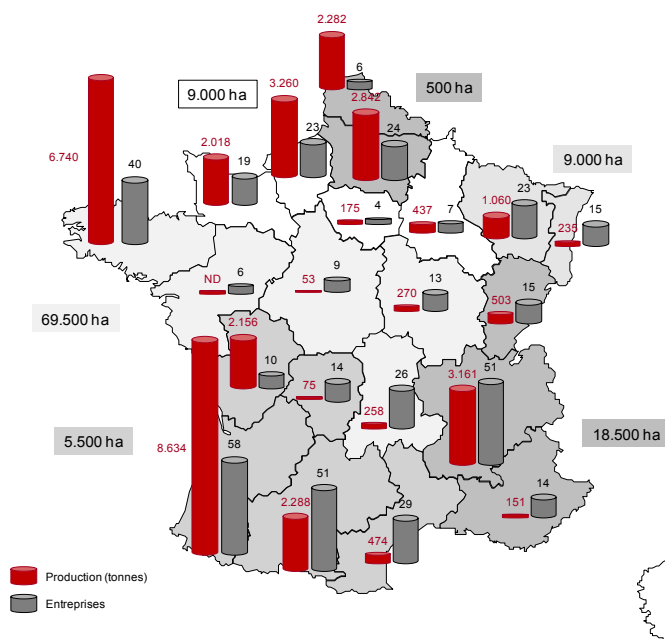


Figure 3. Production des salmonidés et des entreprises salmonicoles par région de France métropolitaine et des espaces aquatiques continentaux disponibles pour la pisciculture d'étang/de pêche (en hectares par bassins hydrographiques).

(Données 2007 ; Agreste 2011 ; Association Française des Professionnels de la pisciculture d'étang).

sont estimées à 112.000 hectares dont les 2/3 sont destinés à l'activité piscicole et 1/3 dédié à des activités de « pêche de loisir ».

La production d'esturgeons est une petite filière qui s'est fortement développée dans les années 90 par la commercialisation de caviar (œufs d'esturgeons). La production annuelle d'esturgeons adultes commercialisés en vifs ou abattus est proche de 300 tonnes, mais s'est surtout la vente d'alevins et de caviar (80 % du chiffre d'affaire de la filière, soit 15 M d'€ environ en 2007) qui a favorisé le développement de cette activité piscicole (Agreste 2011).

II. LA TRUITICULTURE

L'exploitation truiticole n'a été possible qu'après la maîtrise du cycle de la reproduction des poissons. Cette pratique permet de s'affranchir des dates naturelles de ponte liées au photopériodisme, de sélectionner les reproducteurs en fonction de différents critères (croissance rapide, résistance à certaines pathologies, ...) et d'obtenir des poissons stériles (tri- ou tétraploïdes) pour lesquels les besoins énergétiques pour satisfaire la reproduction sont neutralisés. Dans le milieu naturel, les truites se reproduisent en hiver (de novembre à mars) avec des particularités liées aux espèces : la truite arc-en-ciel plus tardivement en janvier/mai, la truite fario plus précocement en octobre/janvier. Néanmoins, un certain nombre de facteurs environnementaux comme le photopériodisme ou la température de l'eau influencent la maturation sexuelle des poissons sous contrôle neuroendocrinien. La reproduction artificielle s'appuie essentiellement sur la possibilité de contrôler la maturation des gamètes en agissant majoritairement sur le photopériodisme. Ainsi, des décalages photopériodiques permettent d'anticiper ou, au contraire, de retarder la production de gamètes matures permettant ainsi de « lisser » la production d'alevins tout au long de l'année sur un site piscicole.

1. Gestion de la reproduction de la truite

Traditionnellement, les géniteurs étaient élevés dans des bassins dédiés, séparés de la production, sans précaution particulière. Alors que la différenciation des sexes est difficile en période de repos sexuel, les géniteurs subissent des changements morphologiques et de comportements importants à l'approche des pontes : les mâles présentent un important développement du maxillaire inférieur avec l'apparition d'un crochet (= bécard) et expriment de l'agressivité vis-à-vis des autres mâles ; les femelles montrent un abdomen

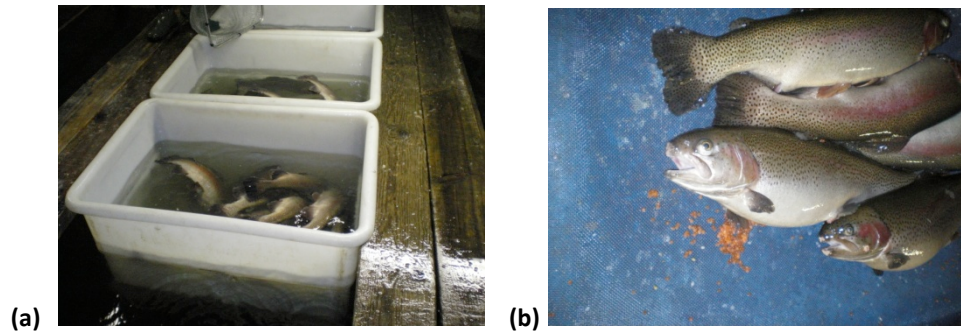


Figure 4. Protocole de collecte des ovocytes de truite.

Les poissons matures sont plongés 5 min dans le bain anesthésiant (iso-eugénol 5 mL pour 90 L d'eau)

(a) et la collecte des ovocytes est réalisée par pression longitudinale sur l'abdomen (b).

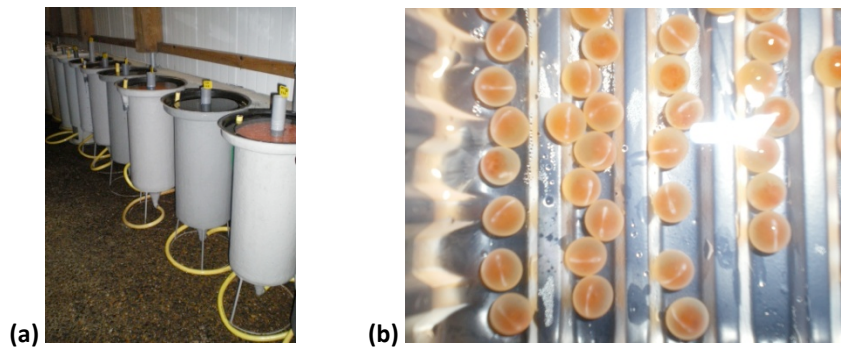


Figure 5. Les œufs sont incubés dans des jarres (a) sur une période de 150 à 200 °C x j.

L'efficacité de fécondation des œufs (b) est testée immédiatement par incubation quelques minutes dans du vinaigre blanc pur afin d'identifier le sillon blanc caractéristique.

ballonné et la papille ano-génito-urinaire proéminente se colore en rouge. La laitance de mâles âgés de 2-3 ans ainsi que les ovocytes de femelles de 4-5 ans permettent une reproduction satisfaisante à une température entre 9 et 14 °C, c'est-à-dire avec des taux de réussite importants de fécondation (95-98 %) conduisant à l'éclosion d'alevins bien formés.

Afin d'améliorer les rendements de production, les pisciculteurs privilégient depuis 15-20 ans (Haffray et coll., 2004), les productions monosexes basées sur une reproduction entre des femelles classiques productrices d'ovocytes et des femelles qui ont été masculinisées (= néomâles) dès les premières alimentations avec de la 17-méthyltestostérone et qui produisent ainsi des gamètes mâles. Les individus issus de ce type de fécondation sont alors toutes des femelles. De même, la production de truites stériles présente pour le pisciculteur un certain nombre d'avantages : (1) les individus ne consomment pas d'énergie pour la maturation sexuelle, de bien meilleurs indices de consommation sont donc observés ; (2) l'absence d'ovaires facilite les étapes de nettoyage/transformation du poisson par la filière agroalimentaire; (3) les « évadés » accidentels ne constituent pas un risque environnemental dans la mesure où ils sont incapables de se reproduire avec d'autres salmonidés sauvages. Les œufs triploïdes sont obtenus après fécondation par traitements physiques (choc thermique 20 min à 26 °C) ou choc mécanique à haute pression (1 minute à environ quelques centaines de bars) voire par traitements chimiques (5-8 heures en présence de colchicine 0,5 mM, (Chevassus et coll., 1983). Ces différents traitements ont pour fonction d'empêcher l'expulsion du second globule polaire lors de la reprise de la méiose post-pénétration de l'œuf par le spermatozoïde. Les alevins issus de ces traitements possèdent alors un stock de 3n chromosomes : deux maternels et un "paternel". Les femelles matures sont anesthésiées et les ovocytes sont collectés manuellement par massage de l'abdomen (\approx 2.000 ovules/kg de poids de poisson ; diamètre moyen : 3-7 mm) dans un tamis afin d'éliminer les différents fluides physiologiques, sources possibles de contaminations microbiennes (Figure 4a et 4b).

Les gamètes mâles collectés de la même manière (ou après prélèvement des gonades chez les néomâles) sont regroupés puis mélangés avec les ovocytes en suspension dans l'eau douce. Des cocktails minéraux permettent d'améliorer le stockage et la fertilité des spermatozoïdes (ex. Storfish™ et Actifish™, IMV Technologies sous licence INRA-IMV-SYSAF). La présence d'eau stimule la mobilité transitoire des spermatozoïdes et permet la fécondation. Au bout d'approximativement une heure, les œufs fécondés subissent un processus nommé « durcissement » lié à l'entrée d'eau dans l'espace périvitellin ; il s'agit d'une étape clé qui signe l'arrêt temporaire des manipulations possibles des œufs. Le

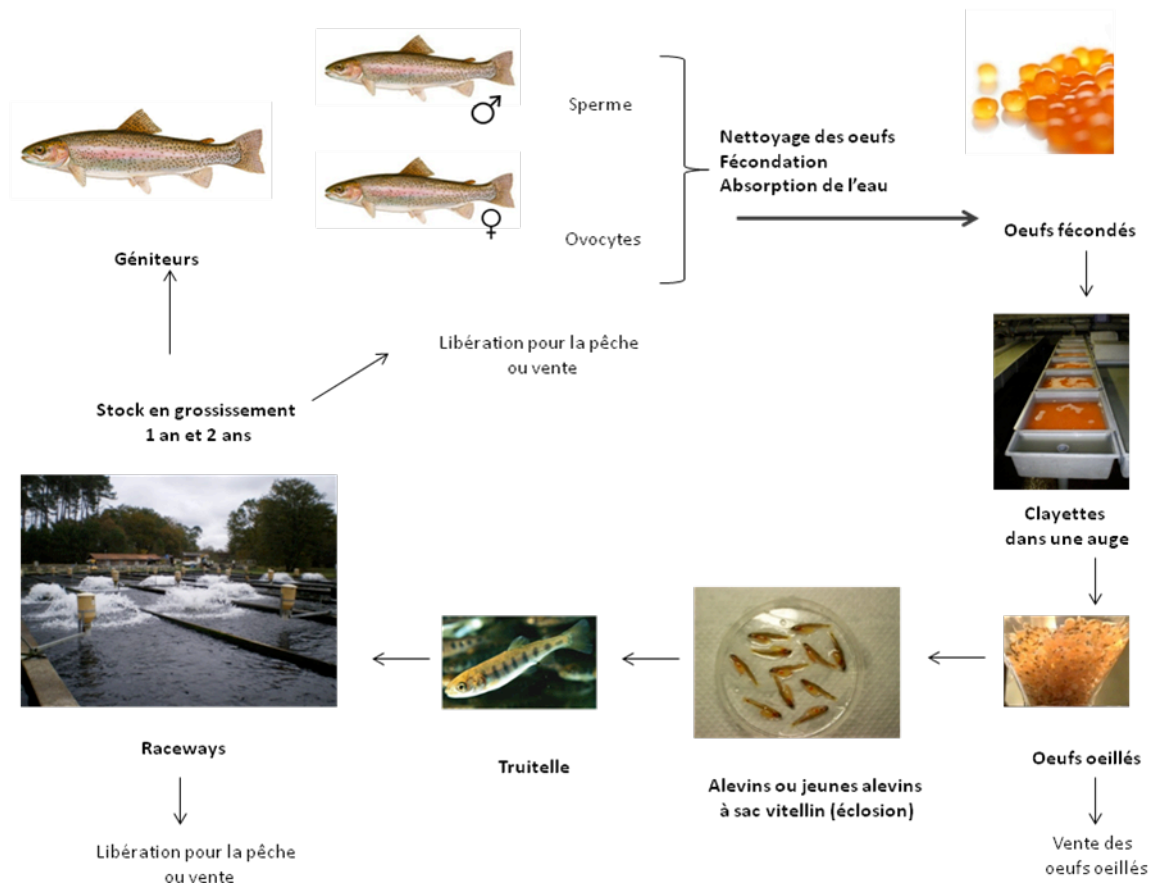


Figure 6. Cycle de vie d'une truite arc-en-ciel en milieu aquacole (*Oncorhynchus mykiss*).

Adapté et extrait du site internet de la FAO (Département des pêches et de l'aquaculture).

développement des œufs s'effectue dans des jarres sous circulation ascendante d'eau (Figure 5a et 5b).

Des traitements préventifs à l'aide de différents biocides (iode, peroxyde d'hydrogène, etc.) permettent de limiter la contamination des œufs en cours d'incubation par des agents pathogènes, en particulier des oomycètes du genre *Saprolegnia* appelés communément « moisissures aquatiques ».

2. Mode de conduite et les animaux produits

Au bout d'une quinzaine de jours d'incubation des œufs dans une eau douce à 10 °C, soit approximativement 150-200 [°C x jour] en fonction des espèces de truite, deux tâches noires correspondant aux yeux du futur alevin peuvent être observées par transparence de l'œuf ; il s'agit du stade « œillé » à partir duquel la manipulation des œufs, interdite pendant l'incubation, peut reprendre. L'éclosion s'effectue à 30-45 jours post-fécondation (= 290 à 460 [°C x j]). En général, les œufs produits sur des sites dédiés à la reproduction sont livrés dans des fermes d'alevinage entre 3 à 8 jours pré-éclosion. Ils sont à nouveau traités avec des désinfectants dans le but de limiter la dissémination inter-sites des éventuels agents pathogènes, puis distribués dans des clayettes en monocouche afin de favoriser les échanges de l'oxygène de l'eau vers les œufs. Les premiers stades de développement de l'éclosion aux premières alimentations sont réalisés dans des auge localisées dans une zone protégée, l'écloserie. A l'éclosion, la larve se dépose au fond de l'auge alors que les reliquats d'œufs ainsi que les œufs morts restent dans les clayettes. Pendant une quinzaine de jours, la larve s'alimente *via* les réserves contenues dans le sac vitellin ; les premières alimentations sont mises en place dès que l'alevin nage à la recherche de nourriture à la surface de l'eau (Figure 6).

Les œufs non éclos, les alevins « malformés » ou morts doivent quotidiennement être éliminés; ils constituent des substrats favorables à la multiplication de microorganismes qui peuvent se révéler pathogènes. Les truitelles (entre 3 et 10 g selon les sites ... et les besoins d'espace liés au planning de production) sont transférées à l'extérieur dans des bassins de pré-grossissement. Les bassins peuvent être de deux types : (i) circulaires (\varnothing : 3-4 m ; h : 1 m) dans lesquels l'eau arrive en périphérie et s'échappe par le centre ; (ii) allongés de type « race-way » (L : 20-30 m ; l : 2-3 m ; h : 1 m) dans lesquels l'eau s'écoule de l'amont vers l'aval avec une légère pente favorisant l'accumulation des déchets à l'aval ce qui facilite le travail d'entretien des bassins. Régulièrement, les animaux sont triés en fonction de leur taille afin

Tableau III.

Plan d'alimentation proposé pour les truites arc-en-ciel d'élevage (eau à 14 °C).

Poids des alevins/poissons (g)	Granulométrie de l'aliment (mm)	Fréquence d'alimentation quotidienne	Taux de rationnement quotidien (exprimé en g d'aliment pour 100 g de masse corporelle)
< 0,2	farine	8-10	3,8
0,2 < X < 0,5	0,5	8	3,5
0,5 < X < 2	0,8	6	3,2
2 < X < 5	1,1	4	3,0
5 < X < 15	1,5	3	2,8
15 < X < 50	2,0	2-3	2,3-1,9
50 < X < 100	3,0	2-3	1,7-1,5
100 < X < 450	4,5	2	1,5-1,0
450 < X < 1.000	6,5	2	1,0-0,8
1.000 < X < 5.000	9,0	2	0,8-0,5

de séparer les dominants (les plus gros) des dominés (les moins gros) pour *in fine* obtenir des lots homogènes.

Dans les fermes aquacoles, le poste « alimentation » est déterminant pour définir la rentabilité de la production. Il est donc essentiel d'optimiser les apports en termes qualitatif et quantitatif (trop peu, les poissons végètent; trop, de l'aliment est perdu... et contribue à augmenter les rejets dans le milieu naturel). Les protéines constituent la principale source d'énergie chez le poisson. Les lipides et, dans une moindre mesure, les glucides peuvent exercer un effet d'épargne sur les protéines, en tant que sources complémentaires d'énergie. Il est également important d'intégrer la température de l'eau, la teneur en oxygène dissous et le poids des poissons dans la détermination de la quantité d'aliment (Tableau III).

En tant qu'animaux poïkilothermes, la température corporelle et donc l'efficacité métabolique sont directement liées aux conditions thermiques du milieu ; dans une eau de température inférieure à 3-5 °C, les fonctions métaboliques du poisson sont très ralenties. Les potentialités digestives des salmonidés sont également très dégradées dans une eau à température supérieure à 20 °C. La concentration en oxygène dissous ($[O_2] > 5,5 \text{ mg/L}$) doit être contrôlée particulièrement après les repas en raison de la digestion. Enfin, les alevins exigent une alimentation plus énergétique et riche en protéines que les adultes. Classiquement, l'aliment pour adulte est constitué de 38 à 50 % de protéines et de 10 à 18 % de lipides. Les régimes riches en énergie peuvent contenir entre 45-50 % de protéines et 18-24 % de lipides, en particuliers les acides gras essentiels polyinsaturés : les acides alpha-linolénique (ou $\omega 3\alpha$), eicosapentaénoïque (EPA), et docosahexaénoïque (DHA). L'aliment distribué aux poissons d'élevage se compose entre 30 et 40 % de produits de poissons issus de la pêche minotière (20 à 25 % de farine de poisson et 10 à 15 % d'huile de poisson), le reste étant constitué de végétaux, de vitamines (A, B, C, D, E, H et K) et minéraux (calcium/magnésium, phosphore, sodium et zinc) voire d'autres additifs (comme les immunostimulants). Les indices de conversion varient de 0,8-0,9 au stade de l'alevinage jusqu'à 1,1-1,3 aux stades adultes (« portion » et « grosses truites »). La supplémentation de l'aliment avec un pigment caroténoïde synthétique, la canthaxanthine, permet d'obtenir la couleur saumonée des truites d'élevages.

La production d'aliments aquacoles représente un marché de niche pour les fabricants d'aliments d'animaux d'élevage, soit 120.000 tonnes annuels, dont 55.000 tonnes pour le marché domestique sur les 22 millions de tonnes d'aliments produit (moins de 0,6 %). Trois fabricants principaux se partagent le marché : Biomar™, Skretting™ et Le Guessant™

Tableau IV.
Principales pathologies infectieuses rencontrées sur la truite arc-en-ciel
en fonction du stade de l'élevage et des saisons
(Ferra, 2008).

Maladies infectieuses d'origine				
Stades	Mois	Parasitaires	Bactériennes	Virales
Alevins	Janvier	Saprolégniose	Flavobactérioses	
	Février	(CuSO ₄ , H ₂ O ₂) Costiase	(Chloramine T-Florfenicol)	NPI SHV/NHI
	Mars	(Prophylaxie/Formol/H ₂ O ₂)		(Prophylaxie/Iode) (Prophylaxie - MRC)
	Avril		Yersiniose	
	Mai	Ichtyophthiriose (Points blancs)	(Prophylaxie/Iode/vaccins)	
	Juin	Gyrodactylose		
Pré-grossissement	Juillet	(Prophylaxie/Formol/sels)	Furonculose	
	Août		(Prophylaxie/Antibiotique/vaccins)	Maladie du sommeil
	Septembre			(Prophylaxie)
	Octobre			
	Novembre			
Grossissement	Décembre			
	Janvier			
	Février		Corynébactériose	Maladie du sommeil
	Mars		(antibiothérapie)	(Prophylaxie)
	Avril	Gyrodactylose		
	Mai	(Prophylaxie/Formol/sels)		
	Juin			
	Juillet		Yersiniose	
Maturation sexuelle	Août		(Prophylaxie/Iode/vaccins)	
	Septembre		Furonculose	
	Octobre		(Prophylaxie/Antibiotique/vaccins)	
	Novembre	Mycoses		
	Décembre			
	Janvier			
	Février			

MRC : maladies réputées contagieuses soumises à déclaration obligatoire (Décret n° 2008-1155 du 7 novembre 2008).
En rouge, les approches mises en œuvre pour limiter l'impact des pathologies sur l'élevage

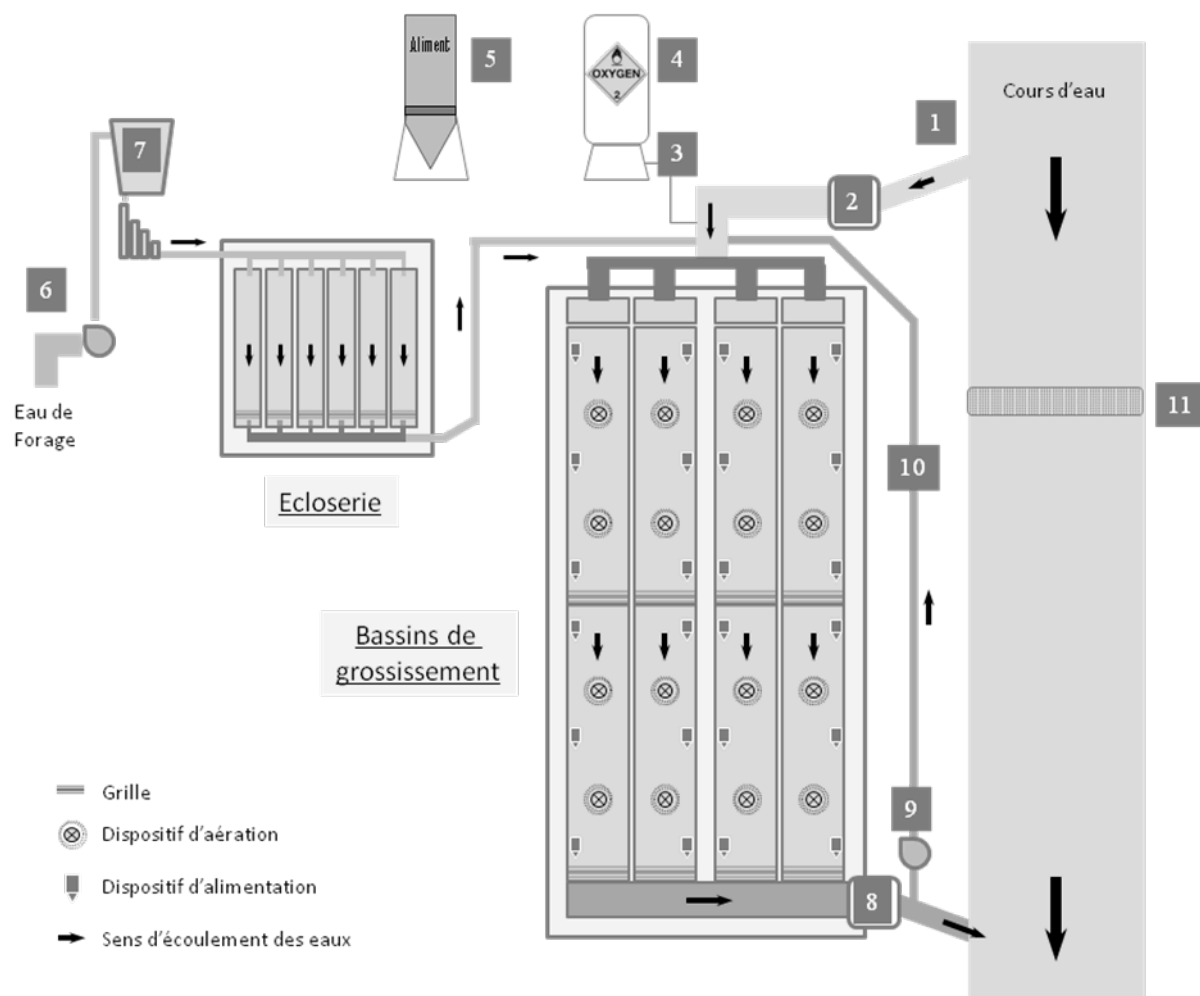
structurés dans un Syndicat Professionnel des Producteurs d'Aliments Aquacoles (SPPA). Alors que depuis juin 2013, il est à nouveau possible d'intégrer des farines animales (hors espèces poissons = protéines animales transformés ou PAT) dans l'aliment aquacole, les acteurs français de la filière excluent ce type d'aliment de la grande et moyenne distribution en raison de l'image très négative de ces produits.

3. Gestion des maladies

Les productions piscicoles sont comme toutes les productions d'animaux de rente confrontées à différentes pathologies (Ferra, 2008). Nous ne développerons pas ici les pathologies non-infectieuses liées à l'environnement (variations de température, de pH ; excès d'ammoniaque ; déficit en oxygène ...), les pathologies nutritionnelles (sous alimentation, suralimentation, mauvaise conservation de l'aliment avec présence de mycotoxines produites par des moisissures ou d'acides gras peroxydés toxiques pour les poissons), et les pathologies génétiques. Les salmonidés sont sensibles à des agents infectieux de nature parasitaire, bactérienne et virale. Bien souvent, les effets conjugués d'une dégradation de l'environnement aquatique et d'une fragilisation du poisson (stress) conduisent à l'apparition des symptômes de maladies infectieuses. Cela se traduit par : (i) une baisse des performances zootechniques, (ii) des modifications du comportement (signes cliniques) et (iii) de l'intégrité anatomique et tissulaire (lésions) des poissons. Les principales maladies infectieuses qui touchent les élevages français de truites arc-en-ciel sont consignées dans le tableau IV.

4. Bien-être animal

La filière piscicole, comme toutes les filières d'élevage d'animaux, est tenue de respecter le bien-être animal tout au long du parcours emprunté par les poissons, de la production à l'abattage. Il s'agit en particulier de veiller au respect de certaines règles : (i) apporter une alimentation quantitativement et qualitativement adaptée permettant aux poissons de satisfaire leurs exigences physiologiques ; (ii) veiller au maintien d'un environnement satisfaisant (les paramètres physico-chimiques de l'eau, pH, matières en suspension, concentration en oxygène, densités adaptées...) ; (iii) prévenir et/ou traiter les pathologies afin de maintenir des conditions sanitaires satisfaisantes ; (iv) s'assurer du bon traitement des animaux lors des tris, du transfert et des transports afin de limiter les stress générateurs d'inconfort pour les poissons mais également augmentant les pathologies. A l'abattage, la mort du poisson doit intervenir le plus rapidement possible. Les méthodes



1. Arrivée de l'eau prélevée
2. Dispositif de traitement de l'eau (dégrillage – correction pH)
3. Point de mesure/correction de l'oxygène
4. Stockage d'oxygène liquide
5. Réserve d'aliment
6. Système de pompage
7. Dispositif d'aération par gravimétrie
8. Traitement des rejets
9. Système de pompage
10. Boucle de recyclage de l'eau (période d'étiage)
11. Dispositif de retenue d'eau muni d'une passe pour poissons migrateurs

Figure 7. Schéma-type d'une pisciculture, adapté du livre de Jalabert, les truites arc-en-ciel : biologie et élevage 2010.

traditionnelles par asphyxie (sortie de l'eau ; saignement à blanc) ont majoritairement été substituées par des méthodes de sacrifice plus rapides telles que l'électrocution, l'engourdissement dans une eau à 4 °C ou la plongée rapide dans une eau salée à température négative.

5. Questions environnementales

L'eau

L'activité piscicole exige une alimentation en eau constante qualitativement et quantitativement (Figure7). Cette alimentation en eau peut provenir soit d'un forage ou d'une source (eau de bonne qualité dont la température est relativement constante), soit d'une eau de surface (rivière) collectée à partir d'une dérivation, à l'aide d'un barrage, soit d'un mélange des différentes eaux. L'eau collectée est filtrée afin d'éliminer les macro-éléments en suspension (débris végétaux majoritairement) puis placée dans un bassin de décantation ; il s'agit de limiter l'apport de matières en suspension (sables ; particules organiques...). Le pH est vérifié et le cas échéant, l'eau doit être chaulée (effet tampon) afin de stabiliser le pH à une valeur proche de la neutralité. Ensuite, l'eau est distribuée dans les différentes zones de la pisciculture : d'abord, dans la zone d'alevinage lorsqu'elle est présente sur le site, afin que les alevins, plus fragiles que les adultes, bénéficient d'une eau de meilleure qualité possible, dites les premières eaux, qui sont ensuite véhiculées dans les zones de pré-grossissement et de grossissement. Régulièrement, le pH et l'oxygénation de l'eau sont contrôlés. La valeur de l'oxygène dissous doit être proche de la saturation mais varie en fonction de plusieurs paramètres : (i) la température de l'eau (ex. valeurs de solubilité de l'O₂ approximatives de 12,5 ; 11,0 et 9,8 mg/L à respectivement de 5, 10 et 15 °C, (ii) de l'heure du jour ou de la nuit en fonction de l'activité photosynthétique des végétaux, (iii) de la pression atmosphérique (chute brutale de la solubilité de l'O₂ en cas d'orages) et (iv) bien sûr de la présence des poissons (espèce, taille, état sanitaire, activité physiologique dont la digestion).

En dessous d'une concentration limite de 5-6 mg/L d'O₂ dissous, les poissons sont en souffrance et il est nécessaire de mettre en place très rapidement des mesures correctives. Les méthodes d'oxygénation les plus simples cherchent à favoriser les contacts eau/air. Un enchaînement de cascades à l'entrée de la pisciculture favorise l'enrichissement de l'eau avec l'oxygène de l'air. Des approches plus actives consistent à brasser l'eau, en tête de pisciculture avec des plateformes à jets ou des tubes en U, au niveau des bassins à l'aide d'aérateurs flottants constitués d'une hélice ou à injecter de l'air au fond des bassins.

Alternativement, des apports d'oxygène peuvent être réalisés pour ajuster les concentrations d'oxygène dissous aux besoins des animaux.

En période d'étiage, si le pisciculteur dispose de l'installation nécessaire, il a la possibilité de prélever par pompage une partie de l'eau issue des bassins de grossissement pour la réinjecter en amont. Au cours de ce cycle, l'eau peut être ré-oxygénée grâce à des tubes en U.

Les rejets

L'élevage de poissons génère deux types de pollution : (i) solide, qui peut être « facilement » traitée par décantation ou filtration mécanique; (ii) soluble, pour laquelle un traitement efficace exige des méthodes très coûteuses analogues à celles mises en œuvre dans les stations d'épuration des eaux usées domestiques. Il faut cependant avoir conscience que les concentrations des substances rejetées sont bien plus faibles en pisciculture. Les rejets générés par l'activité piscicole proviennent principalement de l'aliment qui peut être distribué en excès (en raison des coûts économiques importants de ce poste, les rations sont calculées au plus juste) ou qui peut être mal assimilé par les poissons, de l'activité physiologique des poissons (fèces, urine ...), des produits biocides et/ou médicamenteux utilisés pour prévenir ou traiter les pathologies. Il n'est pas question ici de dimensionner les rejets azotés et phosphorés produits par les poissons (Breton, 2005).

III. L'HOTE, LA TRUITE ARC-EN-CIEL (*Oncorhynchus mykiss*)

1. Historique et répartition géographique

La truite arc-en-ciel a été isolée sur la côte Pacifique de l'Amérique du Nord où elle est présente de l'Alaska jusqu'au Mexique (Figure 8). A partir de la fin du XIX^e siècle, elle a été introduite sur la plupart des continents pour des activités aquacoles mais également des activités de pêche de loisirs. La truite arc-en-ciel a longtemps été classée dans le genre *Salmo*. L'étude morphologique des os de la tête puis les analyses des données moléculaires ont permis de la rapprocher des saumons de Pacifique. Son nom latin a donc évolué (Figure 9) : de *Salmo irideus*, la truite arc-en-ciel a été transitoirement dénommée *Salmo gairdneri*, pour finalement adopter la dénomination *Oncorhynchus mykiss* en 1966 (Behnke, 1966), famille des *Salmonidae*, ordre des *Salmoniformes* et classe des *Actinopterygii*.

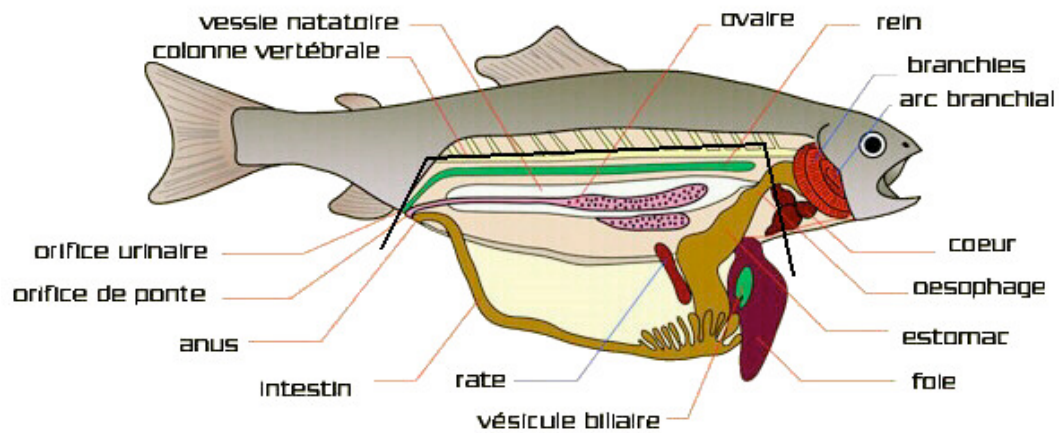


Figure 10. Schéma représentant la truite arc-en-ciel après dissection du flanc droit.

(Site internet : anatomical directions and axes image).

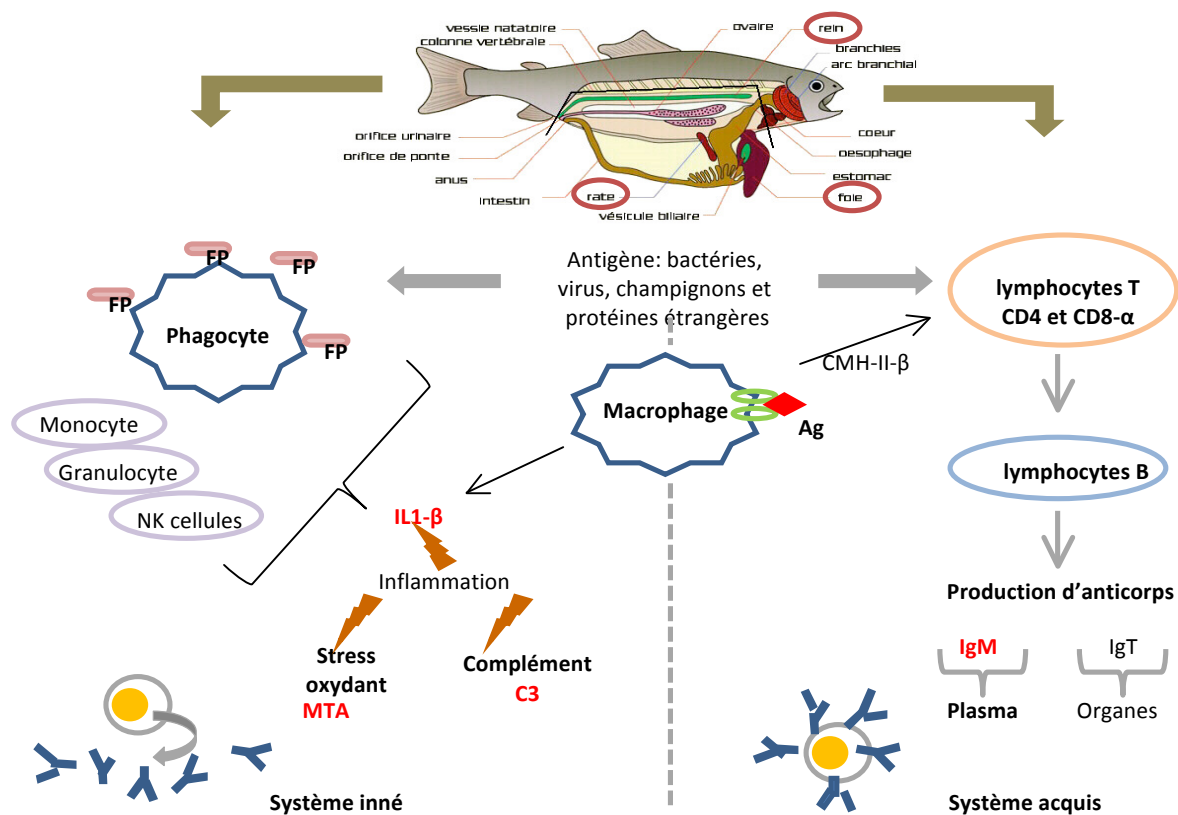


Figure 11. Vue schématique du système immunitaire connu de la truite arc-en-ciel et des biomarqueurs retenus pour cette étude.

2. Caractéristiques et morphologie générale

Le corps fusiforme de la truite arc-en-ciel est conformé à l'identique de celui des autres salmonidés. La coloration générale varie selon le milieu de vie : bleu à vert olive avec une coloration rose le long de la ligne latérale. La présence de points noirs sur l'ensemble du corps et les caractéristiques des nageoires dorsale, anale et caudale permettent de la différencier des autres truites. Les truites arc-en-ciel présentent des tailles variables ; les formes sédentaires mesurent jusqu'à une cinquantaine de centimètres alors que les formes sauvages peuvent atteindre soixante-dix centimètres lorsqu'elles vivent dans des lacs ou migrent vers la mer. Le tube digestif et ses annexes sont concentrés dans la cavité abdominale. La bouche du poisson ne sert qu'à avaler, il n'y a pas de glandes salivaires. En arrière des branchies, le tube débute par l'œsophage qui s'évase en estomac pourvu de cœcums pyloriques. L'intestin est replié et débouche à l'anus situé en avant de la nageoire anale. Le foie est volumineux. Le pancréas est diffus. La vésicule biliaire est reliée à la base de l'estomac ainsi que la rate fixée par du tissu conjonctif à l'intestin. Le rein est longiligne localisé le long de la colonne vertébrale dans laquelle il est enchâssé en partie apicale. Une vessie natatoire localisée sous le rein et au dessus des gonades est utilisée par la truite comme « ballast » au cours de la nage (Figure 10).

3. Système de défense de la truite

Les recherches sur le système immunitaire des poissons, jusqu'ici, ont été réalisées sur des poissons modèles (ex.le poisson zèbre, *Danio rerio* et le médaka, *Oryzias latipes*) ou d'intérêt aquacole (ex.truite, saumon, dorade, carpe ...) (Levraud et Boudinot., 2009 ; Tine et coll., 2011 ; Sun et coll., 2015). Par ailleurs, le séquençage du génome d'autres poissons comme le tétraodon, le fugu ou l'épinoche a contribué également à l'identification de gènes du système immunitaire (Yue et coll., 2006). Le système immunitaire est un ensemble de facteurs humoraux et cellulaires qui a pour fonction de maintenir l'homéostasie, de protéger l'organisme des parasites, infections et proliférations malignes. Ce type de réponse a été très peu étudié chez les poissons. Néanmoins, la présence de xénobiotiques peut affaiblir le système immunitaire d'un organisme, diminuant ainsi ses capacités de défense par exemple vis-à-vis des parasites (Dunier 1996 ; Dunier et Siwicki 1993).

Les principaux organes impliqués dans l'immunité chez les poissons sont le thymus, le rein et la rate. C'est dans les reins, entre les tubules, que se loge le tissu hématopoïétique des adultes. Les poissons possèdent deux reins non symétriques : un rein pronéphrique antérieur situé derrière la tête et un rein métanéphrique moyen accolé à la face ventrale de

la colonne vertébrale. Lorsque le thymus de la truite est stimulé à l'aide de mitogènes, cet organe répond plus intensément à la concavaline A qu'au LPS indiquant une prédominance de lymphocytes T (Castillo et coll., 1990 ; Christensen et coll., 1992). La rate est un organe hématopoïétique typique des vertébrés qui ne possèdent pas de moelle osseuse, mais qui est le lieu de production des anticorps (Zapata, 1983 ; Zapata et coll., 1990 ; Zapata et coll., 1996). Cet organe produit des macrophages, des cellules cytotoxiques non spécifiques (NCC), des cellules présentatrices de l'antigène, des lymphocytes T et B (Zapata et coll., 1990). Les mécanismes de défense des téléostéens font appel à l'immunité non spécifique et spécifique, tous deux incluant des réponses humorales et cellulaires.

Le mucus constitue entre autres une première ligne de défense non spécifique chez les poissons. En raison de sa viscosité, il constitue une barrière physique de surface qui limite l'accès des agents pathogènes à l'hôte. Par ailleurs, il contient beaucoup d'enzymes bactéricides (défensines et lysozymes), d'anticorps (immunoglobulines), de protéase, de facteurs du complément qui sont en mesure de neutraliser les organismes envahisseurs (Watts et coll., 2001 ; Subramanian et coll., 2007). Cette immunité fait également intervenir des cellules circulantes, les leucocytes, aussi appelés cellules blanches par opposition aux globules rouges. Les leucocytes sont classés en trois grandes familles : les lymphocytes, les granulocytes et les monocytes/macrophages. Les lymphocytes peuvent intervenir dans la réponse non spécifique de par leur activité cytotoxique (NCC) vis-à-vis des cellules tumorales (NK) ou infectées par des organismes (Secombes, 1996 ; Froystad et coll., 1998 ; Evans et coll., 2001), les deux autres populations cellulaires jouant quant à elles un rôle important dans l'inflammation et la phagocytose. Chez les poissons, ce sont les monocytes/macrophages qui participent le plus activement à la phagocytose permettant ainsi la destruction des corps étrangers (Kemenade et coll., 1994). A cette réponse à médiation cellulaire s'ajoute une réponse non spécifique à médiation humorale par l'intermédiaire de nombreuses enzymes et protéines tel que le lysozyme, les lectines ou encore le système du complément (Kollner et coll., 2002). Le lysozyme est une enzyme présente notamment dans les lysosomes des neutrophiles et macrophages, libérée dans le sang. Il intervient dans la destruction des bactéries gram positif, avec un effet moindre sur les bactéries gram négatif, en s'attaquant au peptidoglycane présent dans la membrane de ces cellules (Skouras et coll., 2003). Il va ainsi provoquer une lyse cellulaire. Des études ont montré que l'activité du lysozyme était sensible à la présence de contaminants dans l'environnement (Bols et coll., 2001). Cette activité est stimulée chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, lors d'une contamination aux métaux lourds tels que le cadmium et le

zinc (Sanchez-Dardon et coll., 1999). Le système du complément, souvent appelé simplement complément, a un rôle important dans le système immunitaire non spécifique et fait intervenir environ 35 protéines membranaires ou soluble (Holland et Lambris, 2002). Les fonctions du complément sont multiples : il participe à la lise des pathogènes, à la réaction inflammatoire, il peut stimuler la phagocytose ou encore participer à la modulation de la production d'anticorps (DeFranco et coll., 2009). Trois voies d'activation du complément existent chez les humains et ont été retrouvées chez les poissons : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines (Holland et Lambris, 2002). La composante C3 du complément est la protéine centrale du système du complément puisque les 3 voies vont conduire à son activation (Qi et coll., 2011). Récemment des travaux sur des souris C3-déficiente suggèrent l'existence d'une 4^{ème} voie: la thrombine, une molécule impliquée dans la voie de coagulation, pourrait générer des C5a (Amara et coll., 2008 ; Huber-Lang et coll., 2006). Les poissons sont assez uniques dans le sens où pour une même espèce, plusieurs isoformes d'un même composant peuvent exister. Ainsi Sunyer et coll. (1997) ont identifié chez la dorade royale (*Sparus aurata*) 5 isoformes du Complement C3.

La réponse immunitaire spécifique chez les poissons est assez proche de celle des vertébrés supérieurs. Le phénomène de rejet face à une greffe chez le bar commun, *Dicentrarchus labrax*, confirme l'existence d'une réponse à médiation cellulaire cytotoxique chez les poissons (Romano et coll., 2005). A cela s'ajoute une réponse de type humorale par la production d'anticorps. Les poissons possèdent ainsi, tout comme les vertébrés supérieurs, des cellules capables de reconnaître un antigène et de développer une réponse immunitaire spécifique. De plus, des protéines appelées cytokines sont présentes dans les milieux cellulaires et acellulaires afin de servir de messagers intercellulaires. Leur rôle est de contrôler, d'induire ou d'inhiber la réponse immunitaire (Secombes et coll., 2001). Les lymphocytes T peuvent se différencier en lignées cytotoxiques (CD8- α positifs) ou en lignée helper (CD4 positifs) (Miller et coll., 1998 ; Kollner et coll., 2001 ; Reynaud et coll., 2006). La médiation humorale prend une part importante dans la réponse immunitaire spécifique et est localisée dans la rate et le rein antérieur. Les anticorps produits sont dénommés IgD et IgM en raison d'une structure caractéristique analogue de celle des immunoglobulines des mammifères (Castillo et coll., 1993 ; Andersson et coll., 1995). Récemment, l'expression des gènes *tlr* codant pour des récepteurs de type « Toll-like » suggère un rôle important des IgM dans l'immunité innée (Abós et coll., 2013). Par ailleurs, un nouveau type d'anticorps appelé IgT, produit par le rein et la rate chez la truite arc-en-ciel (Hansen et coll., 2005), a été découvert.

Chez la truite arc-en-ciel, le système est étudié dans le contexte de la lutte contre les pathologies rencontrées en pisciculture. L'ensemble des biomarqueurs du système immunitaire retenu pour cette étude est schématisé dans la figure 11. De nombreuses cytokines jouent un rôle de modulateurs du système immunitaire chez les poissons. La plupart des cytokines identifiées chez le poisson présentent des similarités fonctionnelles par rapport à celles des mammifères. On retrouve donc les médiateurs de l'immunité proinflammatoire comme le TNF- α "tumor necrosis factor- α ", ces dernières sont des protéines produites par de nombreuses cellules immunitaires dans le rein et qui ont pour rôle de contrôler : (i) l'intensité et la durée de la réponse immunitaire et (ii) certains processus de différenciation et proliférations tissulaires (DeFranco et coll., 2009). Le TNF doit son nom à ses effets cytotoxiques sur les cellules tumorales. L'interleukine 1 β (IL-1 β) produite par les macrophages, les interleukines IL-3, IL-6 ou l'interféron γ (Secombes et coll., 2001) ainsi que le transforming growth factor β (TGF- β), une cytokine anti-inflammatoire (Harms et coll., 2000). Au cours de l'inflammation, un stress oxydant (Knight, 2000) est généré, dont l'amplitude peut être évaluée à travers l'expression de gènes, *mta* et *sod* qui codent pour la méthalthionéine A et la super oxyde-dismutase, respectivement. La métalthionéine (MT) est une protéine qui joue un rôle important dans la protection contre les effets toxiques des métaux lourds (George et Olsson, 1994). La liaison de MTs avec les métaux a pour fonction de séquestrer ces métaux et ainsi de protéger la cellule (Klaassen et coll., 1999). Des études ont ainsi montré que la concentration en MTs pouvait être augmentée en présence de cadmium, cuivre, zinc, mercure, cobalt, nickel ou encore argent (George et Olsson, 1994 ; Hagger et coll., 2006 ; Van der Oost et coll., 2003).

IV. L'AGENT ÉTIOLOGIQUE DE LA FLAVOBACTÉRIOSE : *Flavobacterium psychrophilum*

1. Classifications taxonomiques et phylogéniques

Le genre *Flavobacterium* appartient à la famille des *Flavobacteriaceae* (de *flavus* : jaune) qui constitue une des principales lignées phylogénétiques au sein du domaine des *Bacteria* (Woese et coll., 1985). À l'origine, ce phylum était constitué des genres *Cytophaga*, *Flexibacter* et *Flavobacterium* et a été renommé *Bacteroidetes* (Bernardet et coll., 2003). Des travaux portant sur l'analyse des profils des protéines totales, de la composition en acides gras membranaires et des séquences d'ADNr 16S ont conduit à d'importants remaniements

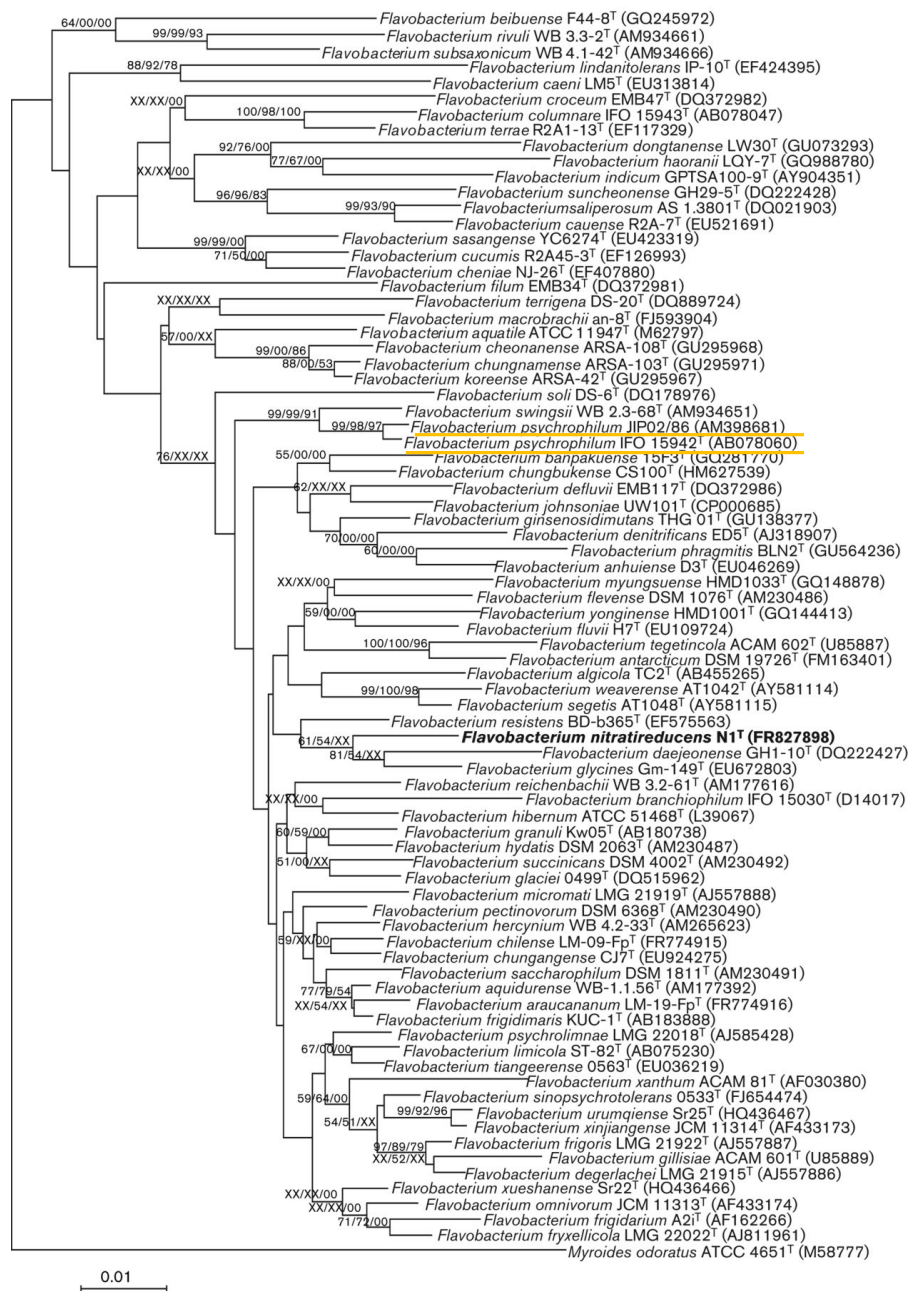


Figure 12. Relation phylogénétique entre des espèces de la famille des *Flavobacteriaceae* basée sur des comparaisons de séquences de l'ARNr 16S (Nupur et coll., 2013).

taxonomiques au sein du groupe CFB (Bernardet et coll., 1996). Les travaux de séquençage de flavobactéries ont permis d'affiner l'arbre phylogénétique (Figure 12) : (i) *F. psychrophilum* JIP 02/86 (Duchaud et coll., 2007), souche type ATCC 49418 (Wu et coll., 2015), THC 02/90 (non publiée) ; (ii) *F. branchiophilum* FL15 (Touchon et coll., 2011) ; (iii) *F. indicum* GPSTA100-9^T (Barbier et coll., 2012) ; (iv) *F. frigidimarum* KUC-1 ; (v) *F. glaciei* 0499^T (non publiées également).

Ces travaux ont montré que la famille des *Flavobacteriaceae* est l'un des constituants majeurs du phylum et, qu'au sein de cette famille, le genre *Flavobacterium* est constitué de plus de 100 espèces dont une nouvelle *F. nitratreducens* a été isolée récemment à partir d'un échantillon d'eau marine collecté dans la baie du Bengale en Inde (Nupur et coll., 2013) (Figure 12). On y trouve *F. psychrophilum*, l'agent étiologique de la flavobactériose, ainsi que bien d'autres bactéries pathogènes pour les poissons appartenant aux espèces *columnare*, *branchiophilum*, *aquatilis*, *succinicans* et *johnsoniae* (Bernardet et coll., 2002).

2. Caractéristiques phénotypiques

F. psychrophilum a la capacité d'infecter toutes les espèces de poissons salmonidés, notamment la truite arc-en-ciel et le saumon *coho* argenté. Cependant, certaines espèces de poissons qui n'appartiennent pas à la famille des salmonidés sont également sensibles à l'infection (carpe, tanche, anguille, ...) (Starliper, 2011). *F. psychrophilum* est un bacille Gram négatif qui se présente sous la forme de fins bâtonnets allongés (\varnothing : 0,20 - 0,75 μm ; L : 1,5 - 7,5 μm) (Figure 13b) et dont le génome est entièrement séquencé (Duchaud et coll., 2007 ; Wiens et coll., 2014). Il s'agit d'une bactérie psychrotrophe qui peut se développer dans une gamme de températures comprises entre 4 et 23 °C (Bernardet et coll., 1989) avec une température optimale de croissance de 15 °C. Sur le milieu solide FLP (composition voir Tableau VII dans le chapitre II), *F. psychrophilum* forme des colonies rondes de 1 à 5 mm de diamètre, de couleur jaune vif, brillantes, convexes et non adhérentes à la gélose (Figure 13a). La description des deux phénotypes retrouvés chez *F. psychrophilum* a été observée par Högfors-Rönholm et Wiklund (2010) montrant que les cellules lisses sont hydrophobes et plus adhésives par rapport aux cellules rugueuses, hydrophiles. Les deux phénotypes cellulaires pourraient être liés non pas à une composition particulière en LPS, mais à des activités enzymatiques qu'il reste à caractériser. Ces deux phénotypes doivent également être étudiés afin d'identifier un lien possible avec le pouvoir pathogène des deux types cellulaires.

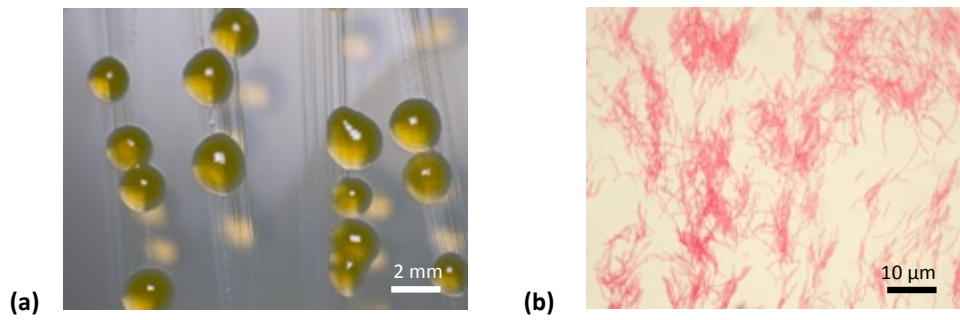


Figure 13. Observations à la loupe binoculaire de colonies de *F. psychrophilum* sur milieu FLP (a) au microscope photonique d'un frottis bactérien après une coloration de Gram (b).

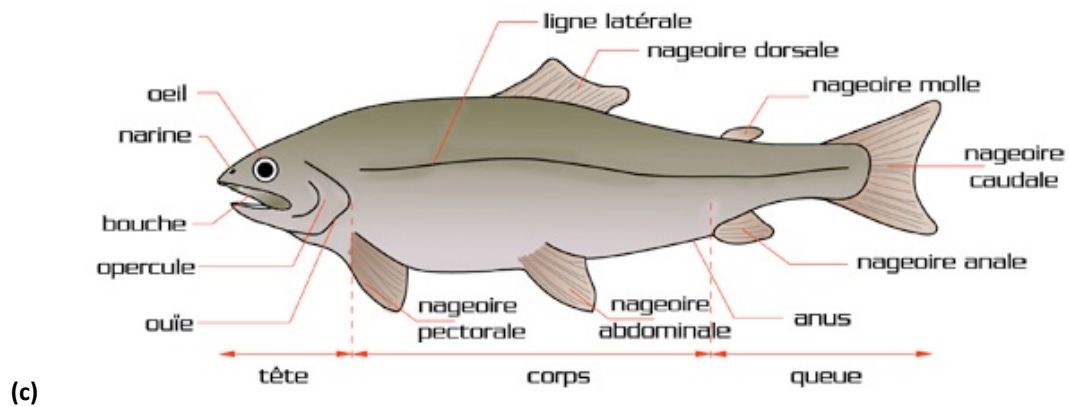
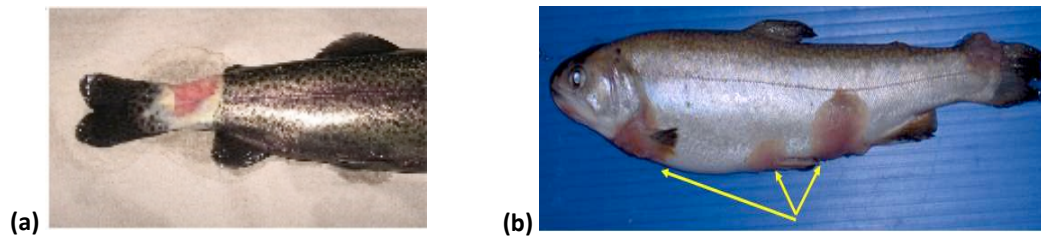


Figure 14. Clichés de lésions cutanées typiques sur des poissons infectés (a, truite arc-en-ciel ; b, saumon coho) par *F. psychrophilum*. L'anatomie externe du poisson est représenté dans la figure 14 c. (Extrait du site : larecre.net).

3. Épidémiologie de la flavobactériose et signes cliniques

Comme la plupart des maladies infectieuses de poissons, la flavobactériose présente des symptômes peu spécifiques. Les signes cliniques se manifestent différemment aux Etats-Unis et en Europe dans la mesure où, très probablement, les stades de développement des poissons atteints sont différents (Wood, 1974, Holt et coll., 1993). Aux Etats-Unis, la flavobactériose apparaît essentiellement sur des productions de truites aux stades juvénile ou adulte (BCWD), alors qu'en Europe, la maladie touche préférentiellement les alevins (RTFS). Dans le cas de la forme BCWD, l'infection se déclare sur des poissons présents dans des installations dont la température de l'eau est inférieure à 12 °C bien que de fortes mortalités de poissons adultes aient été enregistrées dans des eaux à 14 °C aux Etats-Unis. Les premiers symptômes se manifestent par un noircissement de la nageoire adipeuse qui s'étend ensuite du pédoncule caudal à la nageoire caudale. La destruction progressive des tissus cutanés et musculaires provoque l'apparition d'ulcères avec exposition de la colonne vertébrale (Figure 14a et b) conduisant à la mort de l'animal (Davis, 1946). Des lésions peuvent apparaître dans la région antérieure des flancs (Bustos et coll., 1995, Lumsden et coll., 1996) et de la nageoire dorsale (Wood et coll., 1956 ; Borg, 1960 ; Wood, 1974) (Figure 14c). Des manifestations neurologiques ont été observées également chez des poissons qui présentaient une incoordination des mouvements volontaires avec une nage en spirale. La flavobactérie a été isolée d'une cavité crânienne où elle avait provoqué une ostéite et une méningite (Kent et coll., 1989). Des exophtalmies uni- ou bilatérales ont été également décrites, pouvant conduire à la cécité ou à la perte des yeux (Evensen et coll., 1996).

Dans le cas de la forme RTFS, les alevins atteints ne présentent pas forcément de lésions superficielles mais des atteintes viscérales non spécifiques, une anémie des branchies, du foie et des reins accompagnée d'une anorexie (Starliper, 2011). Une augmentation du volume de la rate est souvent observée, ainsi qu'une fragilisation intestinale caractérisée par un prolapsus anal (Baudin-Laurencin et coll., 1989 ; Lorenzen et coll., 1991 ; Bruno, 1992 ; Barnes et coll., 2011).

Les travaux réalisés sur l'interaction entre *F. psychrophilum* et le système immunitaire du poisson s'intéressent essentiellement à la caractérisation du système immunitaire non spécifique par le biais d'observations microscopiques et d'analyses biochimiques de métabolites. Ainsi, les cellules de l'immunité non spécifique de truites arc-en-ciel infectées par la flavobactériose contiennent un nombre important de bactéries viables. Les bactéries *F. psychrophilum* présentant un phénotype cellulaire lisse ou rugueux peuvent proliférer à

l'intérieur des macrophages et des polynucléaires (Decostere et coll., 2001). Il a été montré que l'activité cytotoxique des macrophages est stimulée lorsqu'ils sont contaminés avec des flavobactéries du phénotype rugueux (Högfors-Rönnholm et Wiklund., 2012). Par ailleurs, les interleukines IL1 et IL10 impliquées dans la réponse inflammatoire sont surexprimées lorsque les animaux sont contaminés par *F. psychrophilum*. Le gène *c3* joue un rôle important dans l'activation du complément permettant d'induire une réaction immunitaire plus élevée montrant ainsi que l'infection à *F. psychrophilum* provoque une réponse inflammatoire complexe chez le poisson et donc d'importantes variations de sensibilité à l'infection (Overturf et Lapatra, 2006 ; Langevin et coll., 2012). L'expression génique mesurée sur les poissons malades et apparemment sains, a montré que les biomarqueurs de la maladie, les gènes *mta* et *il1-β*, sont surexprimés dans les branchies, le foie, le rein et la rate des poissons malades (Orieux et coll., 2013).

4. Les facteurs influençant l'apparition de la flavobactériose, l'âge et la température

Les épizooties de RTFS les plus importantes se déclarent sur des poissons de poids compris entre 0,5 et 5,0 g et baignant dans une eau dont la température est inférieure à 10 °C (Bernardet et coll., 1988; Branson 1996). La capacité de *F. psychrophilum* à induire une mortalité sévère chez les poissons juvéniles a été clairement démontrée (Decostere et coll., 2001). Toutefois, une étude épidémiologique révèle que la flavobactériose touche les poissons à des stades de développement de plus en plus avancés. Ainsi des truites arc-en-ciel de 100 g infectées par *F. psychrophilum* ont été recensées (Guichard 2004). Les infections à *F. psychrophilum* peuvent causer des mortalités moyennes comprises entre 30 et 50 % des individus. Elles s'élèvent à 70 % dans le cas de certaines épizooties aiguës touchant les alevins au stade vésiculé pesant de 0,2 à 0,5 g (Santos et coll., 1992). Lors de co-infections avec d'autres agents ichtyopathogènes, comme le virus de la nécrose pancréatique infectieuse, les taux de mortalité observés peuvent atteindre 80 % des lots de poissons (Guichard 2004). Chez les alevins dont la vésicule vitelline est totalement résorbée, la mortalité est moins sévère (≈ 30 % ; Wood, 1974).

5. Les facteurs de virulence de *F. psychrophilum*

Il existe des variants virulents de *F. psychrophilum* (Dalsgaard et coll., 2000 ; Holt et coll., 1993 ; Nematollahi et coll., 2003). Des injections de différentes souches de flavobactéries provoquent des taux de mortalité très différents chez le saumon *coho* : de 0 % pour les souches non-virulentes à 100 % pour les souches très virulentes (Holt et coll., 1993).

Certains facteurs de virulence (les adhésines, les toxines...) ont été étudiés expérimentalement et contribuent à la pathogénicité de *F. psychrophilum* (Dalsgaard, 1993). Il reste toutefois à identifier les facteurs impliqués dans la capacité de la flavobactérie à coloniser et à dégrader les tissus du poisson hôte.

L'adhésion de *F. psychrophilum* à la surface de macrophages de truite arc-en-ciel est fondée sur un mécanisme d'interaction spécifique de type lectine/acide sialique (Dalsgaard, 2001). Des essais de compétition ont en effet montré une inhibition dose-dépendante de l'adhésion de *F. psychrophilum* sur des macrophages de truite arc-en-ciel en présence d'acide sialique. Cependant, il n'existe pas de relation directe entre la capacité des souches bactériennes à adhérer aux macrophages et le degré de virulence. Un mécanisme similaire d'adhésion a été mis en évidence entre *F. psychrophilum* et des érythrocytes de truite arc-en-ciel (Moller et coll., 2003). L'adhésion des bactéries semble être une condition nécessaire (i) au processus de la colonisation et (ii) à l'expression de la pathogénicité. Des observations réalisées au microscope électronique ont montré que les cellules de *F. psychrophilum* sont entourées d'une couche de surface de nature polysaccharidique qui pourrait être impliquée dans la mobilité et l'adhésion de la bactérie (Dalsgaard, 1993 ; Rangdale et coll., 1995). Une telle structure est retrouvée chez *F. columnare*, une flavobactérie pathogène de poissons d'eaux tropicales et tempérées où elle joue un rôle essentiel dans l'adhésion de la bactérie aux branchies, une étape clé dans l'établissement de la columnariose (Decostere et coll., 2000 ; Hesami et coll., 2010).

Le pouvoir pathogène de *F. psychrophilum* peut également être lié à la présence de lipopolysaccharide (LPS), une endotoxine présente chez toutes les bactéries Gram négatives. La fraction LPS de *F. psychrophilum* est hautement immunogène (MacLean et coll., 2001). Elle est constituée à la fois d'oligosaccharides de faible masse moléculaire (environ 16 kDa) et d'antigènes O de haute masse moléculaire (Crump et coll., 2001). Les résultats obtenus par LaFrentz et coll., 2012, indiquent que lors de la vaccination, les doses vacinales contenant des molécules de LPS de hauts poids moléculaires (23-70 kDa) sont nécessaires pour obtenir des réponses en anticorps spécifiques contre *F. psychrophilum*.

Les cellules de *Flavobacterium johnsoniae* se déplacent rapidement sur les surfaces par un processus original connu sous le nom "gliding mobility" ou motilité par glissement (Rhodes et coll., 2011) utilisant des protéines de la famille *Gld* ainsi que des adhésines de surface (ex. SprB). Plus récemment, Laanto et coll., 2014, ont montré également qu'*OmpA* et *SprF* chez *F. columnare*, deux facteurs de virulence chez de nombreux agents pathogènes bactériens sont liés à l'adhérence et à l'invasion, respectivement. Ces protéines sont

présentes chez *F. psychrophilum* (Dumetz et coll., 2008). Très probablement ces molécules sont associées non seulement à la mobilité de la bactérie mais également dans le processus de virulence.

6. Le processus infectieux

Des expériences d'infection expérimentale de poissons par *F. psychrophilum* ont montré qu'il était possible de reproduire la maladie avec toutefois des efficacités contrastées (Austin 1992 ; Rangdale et coll 1995 ; Garcia et coll., 2000 ; Dalsgaard et coll., 2000). Cependant, les voies de transmission de cette bactérie restent méconnues. *F. psychrophilum* a été détecté à la fois dans le mucus de la peau, dans le tissu conjonctif de la nageoire caudale ainsi qu'au niveau des branchies de salmonidés présentant les signes cliniques du RTFS (Bruno, 1992 ; Holt et coll., 1993 ; Madetoja et coll., 2002). La peau et sa couche de mucus forme une barrière tissulaire bien adaptée aux déplacements dans le milieu aquatique et qui, *a priori*, isole bien le poisson des flores pathogènes environnantes. Cependant, l'épiderme est moins épais que celui des vertébrés supérieurs et il n'est pas kératinisé. Aussi, des lésions localisées peuvent se produire facilement au cours des manipulations du poisson en particulier lors des transports et des nombreux tris en catégories de tailles individuelles voisines des animaux, des pratiques de gestion courante en élevages piscicoles. Dans la mesure où *F. psychrophilum* semble appartenir à la flore aérobie de la peau et des branchies (Amita et coll., 2000 ; Guichard, 2004), des altérations branchiales ou cutanées constituent des portes d'entrée de la bactérie chez le poisson hôte.

V. MOYENS DE LUTTE CONTRE LA FLAVOBACTERIOSE

1. La sélection génétique de truites résistantes à *F. psychrophilum*

La lutte contre les maladies infectieuses peut s'appuyer sur la sélection d'animaux naturellement résistants. Depuis plus de 50 ans, les différences de résistances à différents agents infectieux dans les populations d'animaux d'élevage ont pu être associées à la variabilité génétique des individus (Bishop et coll., 2010). Un tel contrôle génétique est observé pour tous les types d'agents pathogènes (parasites, virus, bactéries), et la variation phénotypique observée peut être associée au polymorphisme d'un simple gène majeur ou à des polymorphismes au sein d'un modèle polygénique plus complexe. Il faut toutefois noter que la sélection pour la résistance à une maladie peut en contrepartie rendre les animaux plus sensibles à un autre agent pathogène ou encore à long terme conduire ces agents

infectieux à évoluer et à contourner la résistance sélectionnée (Bishop et coll., 2010). Cette variabilité génétique a pu être mise en évidence par sélection expérimentale, comme chez la truite arc-en-ciel, où les descendants de femelles résistantes au VSHV sont également résistants au virus (Dorson et coll., 1995). Toujours chez la truite arc-en-ciel, les poissons rescapés d'une infection au virus de la nécrose pancréatique infectieuse (VNPI) dans une pisciculture au Japon ont engendré une lignée de plus en plus résistante aux cours des générations suivantes, avec une mortalité d'environ 5 % lors d'infection au VNPI, alors que la mortalité de la souche de référence est de presque 100 % (Okamoto et coll., 1993). Plus récemment, l'utilisation de la souche CSF259-93 de *F. psychrophilum* a permis de sélectionner une lignée génétique de truite arc-en-ciel qui présente une bien meilleure résistance à la flavobactériose que les lignées classiques (Wiens et coll., 2013a et 2014).

La maîtrise de la reproduction a permis également le développement de lignées isogéniques (Quillet et coll., 2007 ; Komen et Thorgaard, 2007) pertinentes pour l'étude de certains caractères quantitatifs complexes, incluant la résistance aux pathogènes et pour la caractérisation des réponses associées à des haplotypes particuliers. Cela a permis l'exploitation d'un matériel expérimental très intéressant pour les études génétiques, avec des lignées sélectionnées pour un certain nombre de caractères : déterminisme du sexe, teneur en lipides du muscle, réponse au stress, croissance sur aliment d'origine végétale, population anadrome ou non... (Quillet, 2002 ; Quillet et coll., 2005 ; Pottinger, 2010 ; Le Boucher et coll., 2012).

Afin de mieux comprendre l'origine de cette variabilité génétique, la recherche de polymorphismes associés aux variations de résistance et donc la recherche de QTL (Quantitative Trait Locus ou LCQ : Locus de caractères quantitatifs) et de gènes candidats peut-être un outil intéressant. L'application d'outils génomiques a été plus tardive chez les poissons que chez les autres espèces d'intérêt agronomique, les travaux de primolocalisation de QTL dans les espèces piscicoles sont encore assez peu nombreux. Néanmoins la majorité des travaux de détection de QTL se concentre sur la résistance aux maladies, confirmant le fort intérêt de la filière et de la recherche pour ces aspects sanitaires (Quillet et coll., 2007). Ainsi il a été montré une association des QTL enregistrés à partir de flores microbiennes présentent à la surface des saumons de fontaines et la résistance de ces poissons à la flavobactériose (Boutin et coll., 2014). Par ailleurs, dix nouveaux QTL ont été identifiés chez la truite arc-en-ciel, en tant que nouveaux marqueurs de sélection étroitement liés à la résistance à l'infection à *F. psychrophilum* (Wiens et coll., 2013b ; Vallejo et coll., 2014).

Chez les poissons, les programmes de sélection mis en place historiquement ont en priorité pour but d'améliorer l'indice de croissance, objectif commun de toutes les filières d'élevage (Quillet et coll., 2007). Les autres critères de sélection (résistance aux maladies, qualité de chair...) sont ensuite apparus progressivement. Ces approches sont prometteuses et très efficaces en sélection car elles expliquent une très grande part de la résistance à l'infection. L'inconvénient majeur de ce type de sélection est que l'agent peut évoluer et contourner la résistance. Ce qui peut sans doute se produire dans la mesure où il y a des mutations et où les poissons sauvages représentent un réservoir non contrôlable, toutes les lignées de truites arc-en-ciel sélectionnées peuvent devenir vulnérables aux infections par la nouvelle souche virale surtout si elles sont par ailleurs trop homogènes génétiquement.

L'analyse de la variabilité génétique de la résistance aux maladies et de ses composantes chez les poissons est donc un domaine de recherche en plein essor. En raison de motiver l'importance économique de certaines espèces de poissons d'élevage et du coût associé aux épisodes infectieux, des recherches sur les facteurs génétiques responsables de ces variations sont en forte progression depuis quelques années. Elles visent à la localisation génomique de la/des mutation(s) causale(s) induisant des variations de résistance. Elles proposent aussi des gènes candidats, et ainsi d'avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse antivirale ou antibactérienne de l'animal hôte.

2. Impacts environnementaux sur la flavobactériose

Les poissons coexistent dans le proche environnement d'un élevage piscicole avec un certain nombre de bioagresseurs. En conditions normales d'élevage, un équilibre s'installe entre ces trois éléments. Cet équilibre sanitaire peut être rompu si un (ou plusieurs) paramètre(s) favorise(nt) la virulence d'un bioagresseur et/ou diminue(nt) la capacité de résistance du poisson. Ce dernier tombe alors malade. Ce phénomène est résumé dans la figure 15. L'infection du poisson causée par un bioagresseur trouve son origine dans des conditions environnementales déclenchantes. Dans un environnement dégradé, pour le poisson, une réaction physiologique s'installe : le stress. Il s'agit en fait d'un syndrome général d'adaptation à une perturbation que constitue le « facteur de stress ». L'approche de Defoirdt présente les différentes stratégies possibles, alternatives à l'usage des antibiotiques, pour contrôler les maladies d'origine bactérienne à l'aide de mesures dites de « biocontrôle ». L'utilisation de micro-organismes destinés à agir sur les différents compartiments : animal hôte (concept probiotique) ou l'agent pathogène (désinfection des

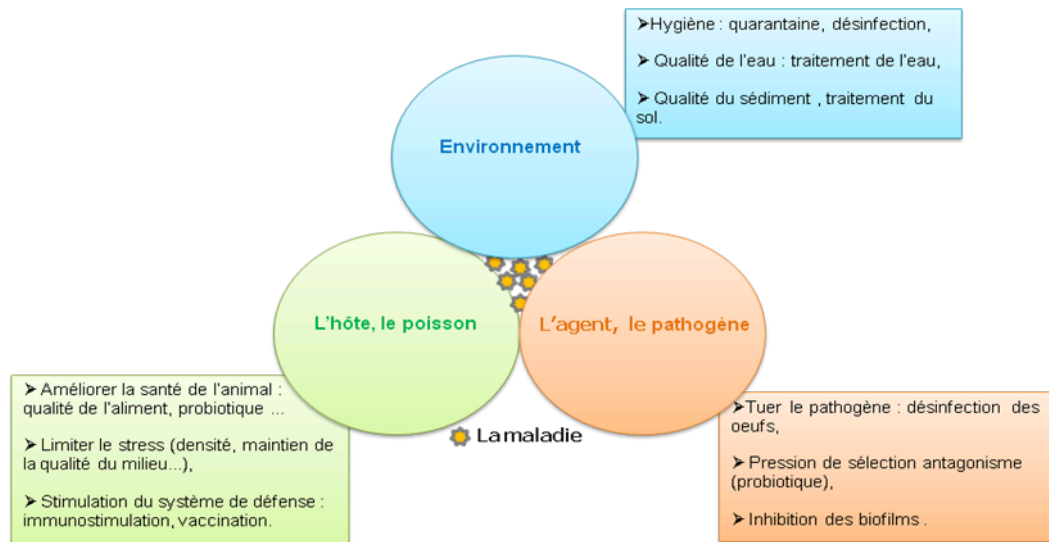


Figure 15. Représentation schématique des stratégies qui peuvent être mises en place pour prévenir et contrôler les maladies infectieuses chez les poissons d'élevage (Defroidt et coll., 2007).

œufs) ou environnement (implantation de probiotique), constitue une stratégie possible, faisant l'objet de cette thèse (Defoirdt et coll., 2007).

Les facteurs environnementaux jouent un rôle essentiel dans l'expression du pouvoir pathogène des micro-organismes. Ceci est particulièrement vrai dans le cas où l'hôte et l'agent pathogène sont soumis aux fluctuations de l'environnement aquatique. Ainsi, il a été montré que la température et la salinité de l'eau ont un impact fort sur l'établissement et la sévérité des infections par *F. psychrophilum* (Holt et coll., 1993 ; Rangdale et coll., 1995 ; Madetoja et coll., 2002). La mortalité des poissons pouvait être significativement réduite par une thermorégulation de l'eau des bassins à 20 °C ou par le contrôle de la concentration en NaCl en dessous de 10 g/L (Holt et coll., 1989). Le photopériodisme artificiel joue un rôle également important car les poissons semblent plus sensibles aux maladies opportunistes (Valenzuela et coll., 2012).

3. Traitement et prophylaxie

Contrairement aux productions d'animaux terrestres, l'arsenal des produits médicamenteux susceptibles d'être utilisés pour lutter contre les agents pathogènes reste assez réduit en élevage piscicole. Pour les entreprises du médicament, le marché piscicole est un marché restreint sans réelles perspectives de rentabilité. Par ailleurs, l'environnement aquatique ajoute un certain nombre de difficultés par rapport à un environnement aérien (méthode d'administration ; contamination du milieu ; impossibilité de confinement...). C'est pourquoi, la filière piscicole privilégie une approche préventive des maladies : (i) limiter l'introduction d'œufs/d'animaux d'origine douteuse à l'échelle du site voire du bassin hydrographique ; mettre en place (ii) des mesures d'hygiène rigoureuses (surveillance de la qualité de l'eau, de l'aliment, de la propreté des bassins ; le soin porté aux animaux au cours des manipulations de tri, de transport ; l'élimination quotidienne des morts ...) et (iii) des plans de nettoyage/désinfection efficaces (des œufs, des poissons, du matériel, des bassins). En France, les GDSA sont habilités à mettre en place des mesures de prophylaxie sanitaire en interaction avec les adhérents (De Kinkelin-Pelletan P et coll., 2014).

Traditionnellement, il existe un certain nombre de molécules biocides autorisées pour lesquelles les conditions d'application en pisciculture ont été optimisées pour une efficacité maximale vis-à-vis de l'agent pathogène ciblé et pour un impact « limité » sur le milieu naturel (l'iode, le peroxyde d'hydrogène, la chloramine T, le glutaraldéhyde, les acides peracétique et peroctanoïque, le bronopol) (Tableau V). Le cas du formol est particulier dans la mesure où, malgré sa grande efficacité dans le traitement externe des poissons contre des

Tableau V.
Caractéristiques des molécules utilisées en traitement externe (GBP).

Molécules	Caractéristiques de base	Applications	Interactions avec le poisson	Impacts sur l'environnement
Ammoniums IV	<p>Cations tensioactifs à propriétés détergentes et désinfectantes (dont le N-alkyl-diméthyl-benzyl ammonium)</p> <p>Ex (i) Agrigerm_1510 : 2 % de chlorure de didecyl dimethyl ammonium – 8 % de chlorure d'alkyl dimethyl benzyl ammonium – 15 % de glutaraldéhyde</p> <p>Ex (ii) Agrigerm_2000 : 100 g/L de chlorure de didecyl dimethyl ammonium – 31,5 g/L de formaldéhyde – 40 g/L de glutaraldéhyde – 32 g/L de glyoxal</p>	Efficacité contre les bactérioses branchiales et cutanées	Désinfection du matériel ou des locaux d'élevage	<p>Ne génère pas de résidu toxique pour le consommateur dans la chair des poissons</p> <p>Le produit devient toxique lorsque la température augmente et /ou la dureté de l'eau est faible</p>
Bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol)	Préparations pharmaceutiques à usage local Concentrations de 0,01 à 0,1 % comme substance antimicrobienne	Actif principalement contre les bactéries (perméabilisation membranaire)	Faiblement absorbé par le poisson	
Formaldéhyde solution aqueuse saturée de formaldéhyde (formol)	Solutions commerciales à 30 % (ou à 24 %)	Propriétés bactéricides à activité lente sur les mycobactéries, sporicides, virucides et fongicides	Utilisé pour lutter contre les mycoses des œufs de salmonidés	Les seuils de toxicité varient en fonction des paramètres (température, dureté, pH)
Chloramine T* (tosylchloramide de sodium) * interdit par la FDA (USA)	Conditionnée sous forme solide	Active contre les bactéries externes, <i>Ichtyophthirius</i> (formes libres dans la colonne d'eau) et les gyrodactyles		Les seuils de toxicité varient en fonction des paramètres (température, dureté, pH)
Chlorure de sodium (NaCl)		Perturbateur des régulations ioniques des microorganismes		
Florfénicol	Antibiotique (famille du chloramphénicol)	Action bactéricide Forte efficacité contre <i>F. psychrophilum</i>		
Hydrogent	Solution d'acide acétique (25,5%) et de peroxyde d'hydrogène (15%)	Action biocide (bactéries, les mycobactéries et les champignons)		
Hypochlorite de sodium (NaClO, eau de Javel)	Doses préconisées en hygiène vétérinaire, à 12° chlorométrique, qui sera neutralisée après utilisation par de l'urée	Pouvoir de désinfection élevé contre les bactéries, parasites et virus.		Toxicité directe ou <i>via</i> dérivés chlorés (chloramines) sur les poissons

agents pathogènes (parasites, bactéries...), le fait qu'il génère une toxicité pour les manipulateurs restreint son utilisation aux seuls usages vétérinaires nécessitant une ordonnance et une préparation extemporanée. En revanche, on ne retrouve pas de résidu toxique dans la chair des poissons. Les posologies recommandées pour un traitement efficace des œufs et des poissons adultes avec le formaldéhyde sont respectivement de 2.000 ppm pendant 15 minutes et de 250 ppm pendant 60 minutes. Le formaldéhyde peut être également utilisé pour la désinfection des aquariums et du matériel piscicoles et, à de faibles concentrations ($< 0,05-0,50$ ppm), pour l'élaboration de vaccins administrés par balnéation ou par voie orale.

Le mode de transmission verticale de *F. psychrophilum* reste encore hypothétique bien que la bactérie ait été détectée dans certains fluides coelomiques et la laitance de saumons adultes (Holt, 1987 ; Ekman et coll., 1999 ; Long et coll., 2014) ainsi qu'en association étroite avec les œufs (Brown et coll., 1997 ; Izumi et coll., 1997 ; Vatsos et coll., 2001 ; Baliarda et coll., 2002). Ces observations suggèrent une transmission de la bactérie par infection intra-ovarienne ou dans la cavité coelomique (Kumagai et coll., 2009, 2011 ; Kohara 2012, 2013). Certains échecs de désinfection d'œufs par des composés iodés connus pour tuer *F. psychrophilum* indiquent la présence possible de la bactérie à l'intérieur de la cellule (Brown et coll., 1997 ; Kumagai et coll., 1998 ; Cipriano, 2005). Dans l'espace périvitellin de l'œuf, la flavobactérie serait protégée de la toxicité des iodophores (Kumagai et coll., 2000). Néanmoins, il semble que la contamination *via* les œufs s'effectue majoritairement par un portage de surface de la flore pathogène. En effet, il a été montré expérimentalement que les alevins issus d'œufs dont la surface avait été infectée artificiellement, subissent une mortalité beaucoup plus importante que celle observée pour les animaux issus d'œufs non infectés (Rangdale et coll., 1997). Plus récemment, des expériences de microscopie électronique à transmission et à fluorescence montrent qu'après contact avec des œufs avec *F. psychrophilum*, l'agent infectieux colonise uniquement la surface des œufs, sans pénétration (Vatsos et coll., 2006). Ces observations sont en accord avec les premiers travaux réalisés par Madsen et coll (2005) qui n'avaient pas permis de mettre en évidence la présence de *F. psychrophilum* à l'intérieur d'œufs incubés en présence de la bactérie. *In vivo*, la contamination de surface des ovocytes se ferait dans la cavité péritonéale des femelles dans laquelle la bactérie peut se multiplier efficacement. Toutefois, il reste possible que la contamination puisse intervenir *a posteriori*, au cours de la fécondation, lorsque les procédés de désinfection de surface sont insuffisamment efficaces.

Tableau V. (suite).

Incimaxx	acide peracétique (5,106%) et de l'acide peroctanoïque (0,376%)	Efficacité bactéricide, fongicide et antiparasitaire		
Iode	Solution aqueuse ou en teinture (solution alcoolique) à 1 ou 2 %. + Forme d'iode + polyvinyl pyrrolidone (iodophores)	Pouvoir bactéricide et fongicide	Désinfectant de surface des œufs	
Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)	Conditionné en solution inodore et incolore à pH acide (500 g/L) ou sous forme solide (percarbonate de sodium ; 275 g/kg)	Efficace contre de nombreux pathogènes	Utilisé pour lutter contre les mycoses des œufs de salmonidés	Pas de résidu toxique pour le consommateur Peu impactant pour l'environnement
Sulfate de cuivre (CuSO₄)	Poudre ou de cristaux bleus (solubilité à 220 g/L d'eau)	Efficacité bactéricide, antiparasitaire, fongicides et algicides		Résidu toxique pour les poissons et l'environnement (restreindre l'utilisation aux seuls bains éclairs ou courts en petit volume)

Tableau VI.

Les antibiotiques autorisés en pisciculture pour lutter contre les infections bactériennes.

Les antibiotiques	Classe	Cible moléculaire	Mode d'action
Fluméquine	Quinolone	ADN gyrase	Inhibition de la réplication de l'ADN bactérien
Acide oxolinique	Quinolone	ADN gyrase	Inhibition de la réplication de l'ADN bactérien
Florfénicol	Phénicolé	Ribosome sous unité 50S	Inhibition de la synthèse protéique des bactéries
Oxytétracycline	Tétracycline	Ribosome	Inhibition de la synthèse protéique des bactéries

4. Diagnostic de la flavobactériose et détection de *F. psychrophilum*

Dans un premier temps, le diagnostic de la flavobactériose peut être réalisé par observation des signes de la maladie. Malheureusement, le bilan clinique est souvent difficile à établir, les symptômes étant non spécifiques. Il est donc nécessaire d'isoler et d'identifier *F. psychrophilum* sur boîte de Petri et/ou au microscope à partir d'organes prélevés sur des poissons malades. L'observation de bacilles fins et flexueux dans la rate ou parfois le rein, ainsi que l'examen sur gélose de colonies jaunes, convexes apparaissant au bout de trois jours après incubation des boîtes à une température de 15-20 °C permettent de confirmer le diagnostic (Holt et coll., 1993). D'autres méthodes complémentaires permettent l'identification de *F. psychrophilum*. Elles incluent les méthodes immunologiques, l'immunohistochimie (Evensen et coll., 1996, 1997), l'immunofluorescence (Lorenzen et coll., 1992 ; Amita et coll., 2000) ou encore l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ; Rangdale et coll., 1995 ; Mata et coll., 2001 ; Lindstrom et coll., 2009 ; Long et coll., 2012). Cette dernière technique est efficace mais exige que les sérums de truite prélevés et testés pour la présence en anticorps anti-*F. psychrophilum* aient été préalablement épuisés avec des cellules de *F. columnare* afin d'éviter les réactions croisées.

L'inadaptation des techniques conventionnelles en routine a conduit au développement de techniques de PCR afin de pouvoir détecter directement un fragment spécifique du génome de *F. psychrophilum* à partir d'échantillons de poissons. Les technologies de PCR conventionnelle ou de PCR-nichée ont été mises au point pour détecter l'*adnr 16S* de *F. psychrophilum* (Urdaci et coll., 1998 ; Cepeda et coll., 2000 ; Madsen et coll., 2000 ; Baliarda et coll., 2002). Ces méthodes permettent la pose d'un diagnostic d'infection au mieux 24 à 48 h après le prélèvement d'animaux contaminés. Aussi, une méthode de PCR quantitative (qPCR) a été mise au point afin de détecter et de quantifier un nombre de copies du gène codant pour l'ARNr 16S (*adnr 16S*) de la bactérie dans les tissus du poisson. La séquence d'*adnr 16S* présente en 6 copies dans le chromosome de *F. psychrophilum* (Duchaud et coll., 2007) apparaît comme une cible de choix pour l'amplification tout en augmentant le seuil de sensibilité lors de la détection (Orieux et coll., 2011).

5. Les traitements thérapeutiques par antibiothérapie

L'utilisation de molécules antibiotiques est préconisée afin de soigner les animaux lorsque la maladie a été diagnostiquée (antibiothérapie) ou, dans un objectif de prophylaxie, afin de prévenir une infection (antibioprévention). Ces traitements sont fortement remis en cause, non seulement en aquaculture, mais plus largement en productions animales voire

également en santé humaine. En effet, l'utilisation massive des antibiotiques pour contrôler les maladies a entraîné une augmentation de la pression de sélection au sein des communautés bactériennes et a favorisé ainsi l'émergence des bactéries résistantes (WHO antimicrobial resistance fact sheet, 2002). Par exemple, des niveaux élevés de résistance à certains antibiotiques (oxytétracycline, florfénicol et l'acide oxolinique) ont été enregistrés chez des souches de *F. psychrophilum* isolés dans des fermes chiliennes, très probablement en lien avec une utilisation abusive d'aliments médicamenteux (Henriquez-Nunez et coll., 2012). Il ne semble pas que ces résistances aux antibiotiques ne soient pas systématiquement portées par des gènes plasmidiques dans la mesure où certains isolats de *F. psychrophilum* ne possèdent apparemment pas de plasmides (Del Cerro et coll., 2010). Les traitements antibiotiques deviennent de moins en moins efficaces et constituent également une menace directe pour la santé humaine et pour l'environnement (Angulo et coll., 2000 ; Cabello et coll., 2006 ; Kum et coll., 2008 ; Shah et coll., 2012). C'est pourquoi, la filière aquacole cherche à promouvoir des stratégies alternatives à l'antibiothérapie pour lutter contre les pathologies d'origine bactérienne. La gamme d'antibiotiques autorisés en pisciculture pour lutter contre les infections bactériennes est relativement restreinte (Tableau VI) : la fluméquine et l'acide oxolinique sont utilisés contre les agents pathogènes *Yersinia ruckeri* et *Aeromonas salmonicida*. Seuls le florfénicol et l'oxytétracycline sont utilisés actuellement en France contre la flavobactériose (Guichard 2004 ; ANSES, 2012). Par ailleurs, la réglementation ne se limite pas à autoriser ces molécules antibiotiques, elle impose un cadre d'utilisation dans lequel l'espèce piscicole, le diagnostic, la dose et la durée du traitement sont précisés ainsi que la période de retrait qui doit être observée pour les animaux traités avant commercialisation.

6. La vaccination

A l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccin commercialisé contre *F. psychrophilum*. Des expériences d'exposition des poissons à *F. psychrophilum* par balnéation, par absorption orale ou anale (Holt 1987) ou par injections intramusculaires ou intrapéritonéales (Dalsgaard 2001 ; Garcia et coll., 2000 ; LaFrentz et coll., 2003) ont démontré la possible transmission horizontale de l'agent pathogène. La présence de poissons malades parmi d'autres animaux sains est également un moyen pour propager la maladie (Lorenzen et coll., 1991). La sensibilité à l'infection expérimentale par *F. psychrophilum* est augmentée par une abrasion cutanée du poisson, confirmant ainsi le rôle de la peau en tant que porte d'entrée de l'agent pathogène (Madetoja et coll., 2000). Néanmoins, on observe une faible reproductibilité dans

l'efficacité de l'infection expérimentale chez le poisson (Iida et coll., 1996 ; Ostland et coll., 1997 ; Decosteres et coll., 2000). Il semble que l'un des facteurs déterminants, sous-estimé jusqu'à présent, soit l'état physiologique des bactéries qui sont utilisées pour réaliser l'infection (Michel et coll., 1999).

Les premiers vaccins contre les maladies bactériennes des poissons d'élevage se sont développés dans les années 70 permettant progressivement une réduction drastique de l'usage des antibiotiques en aquaculture occidentale et contribuant ainsi à améliorer l'image du poisson d'élevage pour le consommateur. Initialement destinés essentiellement aux salmonidés, la vaccination bactérienne s'est progressivement étendue à d'autres espèces. Les vaccins avec AMM ciblant des maladies piscicoles en France sont tous des vaccins à bactéries inactivées avec du formaldéhyde. Ils s'adressent à certaines espèces ciblées, comme la truite arc-en-ciel ou le bar pour les vaccins contre la vibriose due à *Listonella anguillarum* (sérotypes I et II) ou *Vibrio ordalii*, la truite arc-en-ciel pour les vaccins protecteurs dirigés contre *Yersinia ruckeri* dans le cas de la yersiniose ou contre *Lactococcus garvieae* dans le cas de la lactococcose. Il existe également des vaccins contre la furunculose due à *Aeromonas salmonicida* pour le saumon et contre la streptococcose à *Streptococcus parauberis* pour le turbot. Certaines préparations contre la yersiniose, la listonellose ou la « vibriose » présentent une bonne protection alors que d'autres sont nettement moins performantes (ex. furunculose). Il est nécessaire de recourir aux autovaccins pour lutter contre les bactérioses des poissons d'élevage ou également pour lutter contre une dérive antigénique sur un vaccin disposant d'une AMM comme ce fut le cas de façon transitoire pour la yersiniose de la truite arc-en-ciel avant l'intégration du biotype EX5 dans le vaccin commercial (AquaVac® RELERA™ ; Merck Animal Health). Les autovaccins sont également utilisés pour lutter contre les bactérioses des espèces piscicoles « nouvelles » (esturgeon, perche, maigre ou sole) puisqu'il n'existe pas de vaccins avec AMM couvrant les espèces piscicoles ciblées. Les autovaccins sont préparés par un laboratoire vétérinaire habilité à partir d'une (ou plusieurs) souche(s) de l'agent pathogène isolée(s) sur le site contaminé. Les complexes vaccinaux peuvent être alors administrés par balnéation, par voie orale ou par injection avec des efficacités assez contrastées.

Dans la mesure où il n'est pas exclu que des survivants dérivent de l'inoculum qui contient des flavobactéries incomplètement inactivées, certains auteurs ont proposé une approche vaccinale dans laquelle la sous-unité antigénique est constituée de fractions subcellulaires de *F. psychrophilum*. Ainsi, il a été montré que non seulement une fraction enrichie en protéines de la membrane externe (OMPs) protège la truite arc-en-ciel et l'ayu,

mais également que cette protection est plus efficace que lorsque l'immunisation est réalisée avec une suspension de flavobactéries simplement inactivées dans du formol (Rahman et coll., 2002). Trois fractions protéiques distinctes par la masse moléculaire (I = 18-28 kDa ; II = 41-49 kDa ; III = 70-100 kDa) ont été préparées à partir d'une suspension d'enveloppes de *F. psychrophilum* et testées également pour leur capacité à induire une protection chez la truite arc-en-ciel (LaFrentz et coll., 2004). En présence d'adjuvant, la fraction comprenant le lot de molécules III protège mieux les truites (PRS de 94 %) que des cellules entières inactivées. Des observations analogues ont été réalisées par différents auteurs. Par exemple, Nikoskelainen et coll., (2007) ont décrit un plan d'immunisation des truites avec un cocktail antigénique polyvalent alors que Högfors et coll., (2008) immunisaient les poissons avec des fractions protéiques de faibles poids moléculaires. Il reste donc à identifier et à caractériser les protéines membranaires qui sont réellement impliquées dans l'immunoprotection observée. C'est pourquoi un certain nombre de travaux portant sur la caractérisation de protéines localisées au niveau de l'enveloppe de *F. psychrophilum* ont été initiés. Il s'agissait plus particulièrement d'identifier les antigènes de surface qui interagissent avec le système immunitaire de l'hôte et qui sont donc susceptibles de participer au développement d'un vaccin protecteur. Crump et coll., 2001 ont analysé et caractérisé les antigènes de surface de *F. psychrophilum*. Deux antigènes dominants (le LPS, environ 16 kDa ; l'antigène-O, environ 100 kDa) ont été détectés à l'aide de sérums de truites convalescentes. Plus récemment, un troisième antigène (FspA, « *Flavobacterium psychrophilum* specific antigen » 20 kDa) reconnu par le système immunitaire de l'hôte a été identifié chez *F. psychrophilum*. Il pourrait s'agir d'une adhésine en raison de 36 % d'homologies de séquence protéique entre FspA et l'adhésine de *Yersinia pseudotuberculosis* (Crump et coll., 2005). Par ailleurs, un inventaire des protéines de la membrane externe de *F. psychrophilum* a permis d'identifier des protéines cibles candidates dans la mise au point d'un vaccin (Dumetz et coll., 2008). Deux d'entre elles (OmpA/P60, Merle et coll., 2003 ; OmpH/P18, Massias et coll., 2004) induisent une immunoprotection chez la truite arc en ciel (Dumetz et coll., 2006, 2007). Différents cocktails « vaccins » ont été proposés et testés pour leur capacité à induire une protection chez le poisson (vaccin à ADN, *hsp60* ou *hsp70*, Plant et coll., 2009 ; bactéries avirulentes, LaFrentz et coll., 2008 ou atténuées, Alvarez et coll., 2008). Très récemment, une équipe norvégienne a injecté un vaccin composé de cellules de *F. psychrophilum* inactivées ou différents cocktails (divalent, FLAVO IPN ou multivalent, FLAVO AVM6) qui permettent d'induire une protection jusqu'à 87 % contre les infections de l'agent pathogène (Fredriksen et coll., 2013).

VI. OBJECTIFS DE RECHERCHE

Au niveau mondial, les coûts induits par les flavobactérioses sur les poissons d'élevage peuvent être évalués en millions d'euros annuels en raison des pertes d'exploitation (mortalités et pertes indirectes) et des dépenses liées aux traitements (sanitaires et ou antibiotiques). L'étude proposée met en avant une logique de gestion (i) intégrée pour la prévention de la flavobactériose du reproducteur jusqu'au produit commercialisable afin de limiter les risques de contamination et (ii) collective en associant différents sites d'une même chaîne d'élevage.

C'est dans ce contexte que nous avons développé un programme de recherche pragmatique pour lutter préventivement contre les infections à *F. psychrophilum*, sur la durée du cycle de production où les truites se révèlent les plus sensibles. De même, ce programme propose la mise en place d'un outil moléculaire d'identification rapide de *F. psychrophilum* qui pourrait devenir la méthode de routine de dépistage et de diagnostic de la flavobactériose. Les précédents travaux réalisés par Orioux 2011 ont permis de mieux comprendre la relation hôte-pathogène entre *F. psychrophilum* et la truite arc-en-ciel (titration de la bactérie et prévalence dans les sites aquacoles), d'évaluer l'impact potentiel de l'environnement sur cette relation et de développer des mesures prophylactiques possibles pour lutter contre cette maladie.

Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre au point une technique d'identification et de quantification performante de *F. psychrophilum* utilisable en routine (qPCR TaqMan) qui pourrait permettre de limiter (i) la dissémination de la flavobactérie grâce à une meilleure sélection de géniteurs indemnes de la flavobactériose et (ii) le portage de l'agent pathogène *via* les « œufs/alevins ». En association avec la mise en place de mesures rigoureuses d'hygiène dans les élevages, cette approche pourrait réduire sérieusement les épisodes infectieux observés précocement sur les truites juvéniles.

De nombreuses souches bactériennes ont déjà été utilisées en aquaculture pour limiter l'installation des souches pathogènes (Bandyopadhyay et coll., 2008). Les traitements efficaces de désinfection de l'environnement des poissons (auges et bassins), des œufs, voire des poissons eux-mêmes, participent à la création d'un terrain microbiologiquement « vierge » qui est propice à l'installation puis à la colonisation ultérieure de différents agents pathogènes présents dans l'environnement. Nous avons donc dans un second temps cherché à vérifier l'efficacité des traitements désinfectants empiriquement utilisés par les acteurs de

la filière aquacole spécifiquement vis-à-vis de *F. psychrophilum*. Dans un troisième temps, les traitements de désinfection ont été combinés avec l'établissement d'une flore bactérienne « barrière ». Il s'agissait de favoriser l'installation durable de cette flore inoffensive initialement à la surface des œufs désinfectés puis ultérieurement chez les alevins et jeunes truitelles.

Enfin, des essais de vaccination ont été conduits à l'aide de cocktails antigéniques de complexité croissante (lysats de différentes souches de *F. psychrophilum* inactivés à la chaleur ou traités au formaldéhyde ; suspension membranaire ...). Les épisodes de flavobactériose interviennent fréquemment sur de petits alevins (« RTFS ») dont la taille est incompatible avec la vaccination par injection en routine. Nous avons donc privilégié la vaccination par balnéation puis avec rappel ultérieur par injection pour objectif d'obtenir une stimulation des réponses immunitaires.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tableau VII.
Composition des divers milieux de culture
(selon Cepeda et coll., 2004).

	MRS	LB	FLP
Peptone	10 g		
Extrait de viande	8 g		
Extrait de levure	4 g	5 g	0,4 g
Glucose	20 g		0,5 g
Acétate de sodium trihydraté	5 g		
Citrate d'ammonium dibasique	2 g		
Chlorure de calcium			0,2 g
Chlorure de sodium		10 g	
Hydrogénophosphate de potassium	2 g		
Sulfate de magnésium heptahydraté	0,2 g		0,5 g
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0,05 g		
Tryptone		10 g	4 g
Eau distillée		qsp 1 litre	
Agar (milieu solide)	10 g	15 g	10 g
pH ajusté	6,2		7,2-7,4
Stérilisation à 121 °C pendant 15 min			

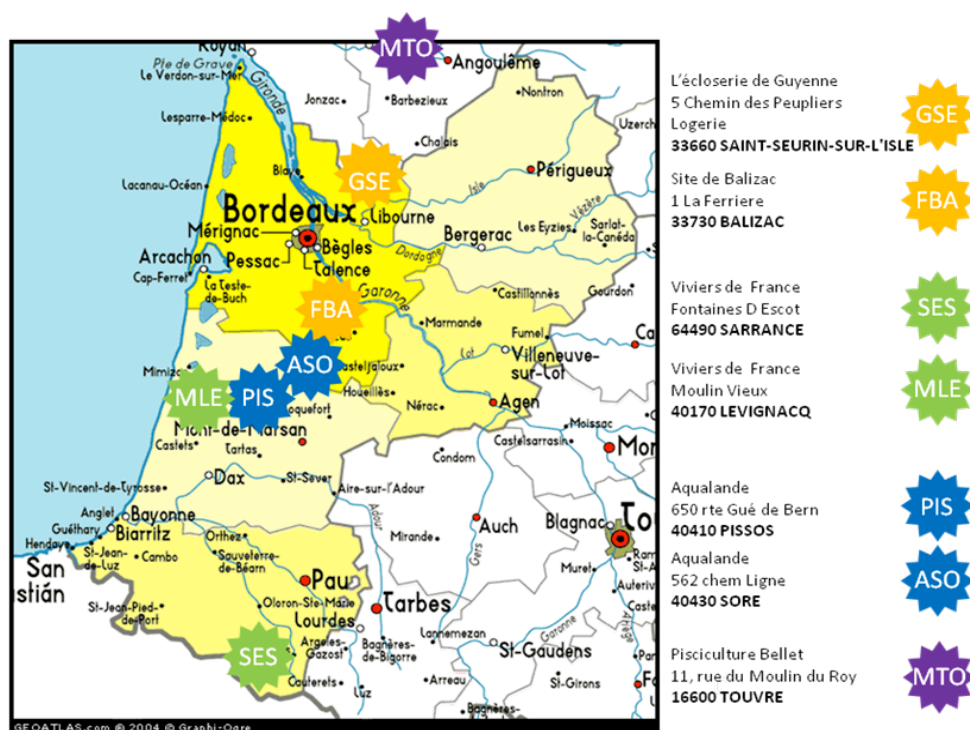


Figure 16. Localisation des sites piscicoles utilisés dans le cadre de cette étude.

I. TECHNIQUES PRÉPARATIVES

1. Bactéries : souches et conditions de culture

La souche de référence *F. psychrophilum* JIP 02/86 (INRA, Jouy-en-josas) et des isolats de *F. psychrophilum* prélevés sur sites piscicoles ont été utilisés dans ce travail de thèse. Les isollements ont été réalisés aussi bien à partir d'organes internes (rate, rein, foie et cerveau), que d'organes externes (peau et branchies). Les flavobactéries sont cultivées dans du milieu FLP (Tableau VII), dans une incubateur à 14 °C, sous agitation orbitale à 150 rotations par minute (rpm), pendant 48 à 72 heures. Le développement des cellules est suivi par des mesures régulières d'absorbance à 600 nm (A_{600}). Les cultures sont arrêtées peu avant la fin de la phase exponentielle de croissance ($A_{600} = 0,5$). L'absence de contaminants dans les préparations bactériennes est vérifiée par des isollements et observations au microscope photonique (objectif $\times 1000$) après coloration de Gram.

Au cours de la campagne 2011-2012, sur les sept sites piscicoles (Figure 16), 695 prélèvements ont été réalisés et isolés après croissance sur milieu FLP à 14°C pendant trois jours. Chaque colonie ressemblant à *F. psychrophilum* a été remise en culture puis ensuite conservée dans le milieu FLP en présence de 40 % de glycérol, en cryotubes à - 80 °C. Au final, seuls 55 échantillons ont été confirmés *F. psychrophilum* par PCR classique avec les amorces spécifiques de l'agent pathogène (DelCerro et coll., 2002). Les autres bactéries également utilisées dans le cadre de cette thèse sont consignées dans le Tableau VIII. Ces micro-organismes ont été cultivés dans les milieux FLP, MRS ou LB (Tableau VII) (Cepeda et coll., 2004).

2. *Escherichia coli* : souches et conditions de culture

La souche JM109 (Promega) de *E. coli* [*endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *relA1*, *supE44*, $\Delta(lac-proAB)$, [*F'* *traD36*, *proAB*, *laqI^qZΔM15*]] a été utilisée comme bactérie hôte pour le clonage et l'amplification des plasmides. Elle est cultivée dans du milieu LB à 37 °C sous agitation (150 rpm). Le milieu de culture est supplémenté avec de l'ampicilline (100 µg/mL) pour sélectionner les clones portant le plasmide.

3. Vecteur de clonage

Le vecteur de clonage pGEM®-T Easy (Promega) a été utilisé pour le clonage de séquences amplifiées par PCR. Ce vecteur confère à la bactérie recombinée la résistance à l'ampicilline. Le multisite de clonage se situe dans le fragment d'ADN codant pour le peptide

Tableau VIII.
Souches bactériennes utilisées dans cette étude.

Espèces	Souches	Origine	Milieu de culture
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	64 30-04-07	BSA	FLP
	194-08	LPL	FLP
	2829-08	LPL	FLP
	NCIMB 47	NCIMB	FLP
<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	FL15	INRA Jouy-en-Josas	FLP
<i>Flavobacterium columnare</i>	103531	CIP Institut Pasteur	FLP
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	100931/1	LPL	FLP
	100931	CIP Institut Pasteur	FLP
<i>Flavobacterium frigidarium</i>	107124	CIP Institut Pasteur	FLP
<i>Flavobacterium hydati</i>	104741	CIP Institut Pasteur	FLP
<i>Flavobacterium psychrolimnae</i>	108326	CIP Institut Pasteur	FLP
<i>Flavobacterium glaciei</i>	109489	CIP Institut Pasteur	FLP
<i>Flavobacterium (chryseobacterium) indologenes</i>	08-1996	LPL	FLP
<i>Listeria innocua</i>	07-10	BSA	LB
<i>Serratia liquefaciens</i>	6603.1	LPL	LB
<i>Escherichia coli</i>	S17-1	PROMEGA	LB
<i>Bacillus subtilis</i>	I-1433	CIP Institut Pasteur	LB
	I-1438	CIP Institut Pasteur	LB
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	I-1435	CIP Institut Pasteur	LB
	I-1436	CIP Institut Pasteur	LB
<i>Yersinia ruckeri</i>	1884-07	LPL	FLP
<i>Pedicoccus acidilacti</i>	I-1654	CIP Institut Pasteur	MRS
	MA 18/5M	Bactocell	MRS
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	I-1450	CIP Institut Pasteur	MRS
<i>Lactococcus lactis</i>	I-2683	CIP Institut Pasteur	MRS
<i>Vibrio anguillarum</i>	AU 1410	Chili	FLP
<i>Aeromonas salmonicida</i>	AU 3103	Chili	FLP

BSA : Bordeaux Sciences Agro

LPL : Laboratoire des Pyrénées et des Landes

Université Andrés Bello, Laboratoire de pathologie des organismes aquatiques (Chili)

alpha de la β -galactosidase permettant une sélection des colonies recombinantes par le système blanc/bleu.

4. Site expérimental piscicole

Les poissons étudiés au cours de ce projet sont majoritairement des truites arc-en-ciel qui proviennent de cinq sites piscicoles volontaires sélectionnés pour participer à cette étude : le site (SES), une écloserie ; les sites (MLE), (ASO) et (MTO) combinent les deux productions (écloserie et grossissement) ; le site (PIS), un site de ponte et d'écloserie. Deux sites piscicoles (GSE) et (FBA) ont été également inclus en raison de la production d'esturgeons, économiquement importante en Aquitaine et qui présentent des épizooties suspectées à *F. psychrophilum* récurrentes (Figure 16).

Des visites régulières des 7 sites sont programmées mensuellement afin de collecter les données zootechniques. Des prélèvements biologiques sont réalisés sur les sites (eau, boues de sédimentation, biofilm, sang, rate, rein, foie et cerveau sur 7 poissons pris au hasard par site). Pour chacun des isolats bactériens et des échantillons, une nomenclature et un code pisciculture ont été adoptés.

5. Extraction des acides nucléiques

Les extractions d'ADN génomique ont été réalisées à l'aide du kit "DNeasy Blood and Tissue Kit" de Qiagen selon les protocoles préconisés par le fournisseur : (i) en microtube : à partir d'organes (foie, rein, intestin et rate) de poissons en utilisant le "spin column protocol"; et (ii) en microplaques de 96 puits, en utilisant le "DNeasy 96 protocol".

Extraction des ARN et synthèse des ADNc (transcription inverse RT)

Les organes des poissons (rein, rate, foie) sont disséqués rapidement en conditions d'asepsie contrôlées, puis déposés dans un microtube contenant du tampon et des inhibiteurs de RNAses (RNA later, Qiagen) et stockés à - 20 °C. Les ARN totaux sont extraits avec le kit Absolutely RNA Miniprep Kit (Agilent technologies) selon les recommandations du fournisseur. Les ADNc sont obtenus à partir des ARNs à l'aide du kit AffinityScript[®] multiple temperature RT (Agilent Technologies). Les ADNc sont conservés à - 20 °C.

Les préparations des ADN et ARN ont été analysées qualitativement par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % (Cuve Elec, Amersham) puis stockées à - 80 °C pour les ARN et quantitativement par dosage spectrophotométrique (NanoVue[™], GE Healthcare).

Tableau IX.
Constitution du mélange réactionnel (PCR).

Mélange réactionnel	Volume (µL)	[Concentration] finale
Tampon [5X]	5	1X
MgCl ₂ (25mM)	1,5	1,5 mM
dNTP (10mM)	0,5	200 µM
Amorce 5' (10 µM)	0,25	100 nM
Amorce 3' (10 µM)	0,25	100 nM
Matrice	variable	
GO Taq (5 unités/µL)	0,2 µL	1 unité / réaction
H ₂ O qsp	25	

Tableau X.
Caractéristiques des amorces spécifiques d'*Oncorhynchus mykiss*.

Gène	Numéro d'accession	Code	Séquence nucléotidique (5'-3')	Taille d' l'amplifiat (pb)
Gènes de ménage				
<i>ef1α</i>	NM_001124339.1	Om_ef1a_1439_fw Om_ef1a_1525_rv	GTGAATTCTCTCCACAGG AGTATAGAGCTCAGGTTTCGAGAC	86
<i>gapdh</i>	NM_001124209.1	Om_gapdh_1077_fw Om_gapdh_1143_rv	GCTACCGAACTACGTCATGTG TTTCTCAGGCAAGGGCGATA	66
Réponse au stress				
<i>mt-a</i>	M18103.1	Om_mta_269_fw Om_mta_327_rv	TGACATCACAATGCAGTCCATT GCTATGCTCAAGATGGTACAACCT	58
Cytokine				
<i>il-1β</i>	AJ278242.2	Om_il1β_923_fw Om_il1β_987_rv	GCCTCCAATAGAGATCCTCTACA AACCAGTCCTGATCGTAGA	64
Immunoglobuline				
<i>igm</i>	AY870258.1	Om_igm_1709_fw Om_igm_1777_rv	ACCCAACCTAGTTAACCTCAGC ACACAACACAACCTCTACTGG	68
Caspase				
<i>c3</i>	L24433.1	Om_c3_4784_fw Om_c3_4845_rv	ACATCCAGAGACTACAGAGAAGT GTTGTGATCTGGTTGATGAACTCA	61

6. Amplification génique par PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction) permet l'amplification sélective de segments d'ADN conduisant à l'accumulation d'un grand nombre de copies du fragment. Les produits de PCR peuvent être alors utilisés pour les expériences de génotypage, de clonage, ou de séquençage. Les réactions d'amplification sont réalisées dans des thermocycleurs programmables (MasterCycler[®], Eppendorf). Le mélange réactionnel de PCR est celui décrit dans le tableau IX selon les conditions suivantes : (i) une première phase de dénaturation (10 min à 95 °C) ; (ii) 35 cycles successifs composés des trois étapes suivantes : la dénaturation de l'ADN (20 sec à 95 °C) ; l'hybridation des amorces sur la matrice (20 sec à 62 °C) ; et l'élongation de l'ADN (1 min à 72 °C) ; (iii) une extension finale (1 min à 95 °C). Les produits d'amplification et les marqueurs de taille (DNA Ladder Fast, Euromedex) sont alors séparés par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1,5 % (Cuve Elec, Amersham).

7. Clonage moléculaire

Les fragments d'ADN d'intérêt sont introduits dans un vecteur de clonage nommé pGEM[®]-T Easy (Promega). Brièvement, la réaction de ligation est réalisée en présence du produit de PCR d'intérêt, du tampon de ligation, du vecteur de clonage et de la T4 DNA ligase (Promega), suivant les indications préconisées par le fournisseur. Les bactéries thermocompétentes *E. coli* JM109 (Promega) sont transformées en présence de 2 µL de la réaction de ligation par choc thermique à 42 °C pendant 45 secondes. Deux minutes après le choc thermique, 950 µL de milieu SOC sont ajoutés à la solution bactérienne, puis ce mélange est incubé pendant 1h30 à 37 °C. La suspension bactérienne est étalée avec 100 µL d'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) à 0,1 M et 40 µL de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galacto-pyranoside) à 50 mg/mL pour la sélection blanc/bleu sur des boîtes de Petri contenant un milieu nutritif (LB + agar) et l'antibiotique (ampicilline à 100 µg/mL). Ces boîtes sont incubées toute la nuit à 37 °C.

Criblage des colonies par PCR, extraction et purification des plasmides

Seules les bactéries ayant intégré le pGEM[®]-T sont capables de se développer sur le milieu sélectif. La sélection blanc/bleu permet de discriminer les colonies qui contiennent les plasmides portant un fragment d'intérêt. L'ADN des colonies blanches est analysé par PCR à l'aide d'amorces spécifiques de gène cloné. Les colonies positives sont ensuite repiquées en milieu liquide LB supplémenté avec de l'ampicilline et incubées à 37 °C toute la nuit.

Tableau XI
Caractéristiques des gels de polyacrylamide

Solution stock de polyacrylamide (T = 40 % ; C = 2,5 %)		
Acrylamide 37,5 % (p/v)		
N, N' méthylènebisacrylamide 1,0 % (p/v)		
Gel moyen (80 mm × 60 mm × 0,75 mm)		
Quantités pour 4 gels	Gel de concentration T = 4,8 %	Gel de séparation T = 10 %
Sol. polyacrylamide 40 % (p/v)	6,25 mL	1,80 mL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	3,75 mL	-
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	6,20 mL
SDS 10 % (p/v)	250 µL	150 µL
H ₂ O, qsp	qsp 25 mL	qsp 15 mL
APS 10 % (p/v)	160 µL	45 µL
TEMED	40 µL	15 µL

L'extraction des plasmides est réalisée à partir du kit "Qiaprep spin miniprep" de Qiagen, suivant les indications préconisées par le fournisseur. Les plasmides extraits sont analysés quantitativement et qualitativement par dosage spectrophotométrique, en gel d'agarose analytique et par PCR.

II. TECHNIQUES ANALYTIQUES

1. Analyse RT-PCR en temps réel, quantification de *F. psychrophilum*

La RT-PCR quantitative en temps réel permet l'amplification d'ADNc, issus d'une transcription reverse d'ARN purifié à partir des échantillons de poissons. Le mélange réactionnel (12 µL) de la Q-PCR est constitué de 4 µL d'eau milliQ, de 6 µL SybrGreen [2X] (Stratagene), de 0,12 µL d'amorce sens et anti-sens (100 nM), de 0,18 µL de Rox (30 nM dilution au 1/500^e), et de 2 µL d'ADNc (normalisation des ARNs dilués de façon à obtenir 2 ng par puits), c'est-à-dire de l'ADN complémentaire obtenus à partir de la transcription reverse des ARN totaux prélevés dans des organes de truite arc-en-ciel. La réaction de PCR est constituée (i) d'une première phase de dénaturation de 3 min à 95 °C ; (ii) 35 cycles successifs composés des deux étapes suivantes : la dénaturation de l'ADN (20 sec à 95 °C) ; l'hybridation / élongation des amorces sur la matrice (30 sec à 60 °C) et la courbe de dissociation. Les amorces utilisées pour l'analyse de l'expression des gènes sélectionnés chez la truite sont répertoriées dans le tableau X.

2. Comparaisons et sélection des amorces

Les comparaisons de séquences nucléotidiques avec les banques de données sont réalisées en utilisant les données publiques à l'aide d'algorithmes de type BLAST (Basic Local Alignment Searching Tool) (Altschul et coll., 1990) disponibles sur le site, *GenBank*, NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Pearson, 1990). L'alignement de ces séquences est réalisé par le logiciel BioEdit avec l'algorithme ClustalW.

Les amorces utilisées ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer3 (Rozen et coll., 2000) avec les conditions suivantes : une température d'hybridation des amorces à 60 °C, une haute stringence contre la formation de dimères d'amorces, un pourcentage de GC autour de 50 % et une taille des amorces égal à 20 pb. Les amorces ont été synthétisées par la société Biomers. Les logiciels PerlPrimer et Primer3 ont permis de s'assurer que les oligonucléotides ne faisaient pas de dimères d'amorces.

3. Normalisation des données

L'appareil de PCR en temps réel «Mx3000P» (Agilent) est un thermocycleur rapide, couplé à un microspectrofluorimètre. Le pilotage par ordinateur permet l'acquisition en temps réel des données. Le SybrGreen est un fluorophore capable de se lier à l'ADN double brin ; au cours de cette interaction, il devient fluorescent. Pendant la réaction de polymérisation en chaîne et à chaque cycle d'amplification, le SybrGreen se lie à l'ADN néosynthétisé. L'intensité de fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation et augmente donc à chaque cycle d'amplification. L'intensité de fluorescence enregistrée en fonction du nombre de cycles d'amplification adopte l'allure d'une courbe sigmoïde. Au cours de la phase exponentielle, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN néo synthétisée et permet donc de quantifier le nombre de copies de l'ADN initial. Le cycle de PCR significatif, appelé C_T pour cycle threshold, est observé lorsque l'intensité de fluorescence sort du bruit de fond. Une seuil est fixé de façon à ce qu'il coupe la courbe d'amplification au début de la phase exponentielle. Il existe deux principaux types de quantification : (i) la quantification absolue, qui consiste à déterminer le nombre exact de copies de la matrice cible. Cette approche exige de disposer d'une gamme calibrée de standards dilués dont le nombre exact de copies est connu ; (ii) la quantification relative, qui cherche à comparer le nombre de copies du gène cible dans deux conditions données avec celui d'un gène de référence contenu dans le même échantillon biologique.

Dans le cadre de nos expériences, nous avons choisi une quantification relative selon la méthode de Pfaffl, (2001) et Vandesompele et coll., (2002). Des PCRs effectuées en utilisant différentes dilutions d'ADNc permettent d'obtenir la pente (slope) de la courbe $C_T = f(\log[\text{concentration}])$ donnée par l'appareil. L'analyse de gènes, qualifiés de "gènes de référence" permet de normaliser les données et de comparer les échantillons entre eux. Nous avons choisi deux gènes de référence qui sont considérés comme stables chez la truite arc-en-ciel, à savoir les gènes *ef1α* et *gapdh* qui codent pour le facteur d'élongation et la glutaraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase respectivement. La pente permet par ailleurs de calculer l'efficacité (E) de la réaction de PCR suivant la formule : $E = 10^{-1/\text{pente}}$ dont il est communément admis qu'elle soit comprise entre 1,9 et 2. Une efficacité de 2 correspond à une efficacité parfaite de 100 %. Le rapport entre le taux de messagers du gène d'intérêt « condition 1 » et celui du gène d'intérêt « condition 2 » est normalisé par rapport au gène de référence ; il se calcule à l'aide de la formule suivant :

$$R = N'1 / N'2 = 2^{-[(C_{T \text{ gène 1}} - C_{T \text{ réf 1}}) - (C_{T \text{ gène 2}} - C_{T \text{ réf 2}})]}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(\Delta C_{T1} - \Delta C_{T2})}$$

N'1 est la quantité normalisée d'ADNc du gène d'intérêt (condition 1)

N'2 est la quantité normalisée d'ADNc du gène d'intérêt (condition 2)

$C_{T \text{ gène 1}}$ est le C_T obtenu lors de l'amplification du gène d'intérêt (condition 1)

$C_{T \text{ gène 2}}$ est le C_T obtenu lors de l'amplification du gène d'intérêt (condition 2)

$C_{T \text{ réf 1}}$ est le C_T obtenu lors de l'amplification du gène de référence (condition 1)

$C_{T \text{ réf 2}}$ est le C_T obtenu lors de l'amplification du gène de référence (condition 2)

On considère généralement qu'un gène est sous exprimé quand son rapport d'expression est inférieur à 0,5 et qu'il est surexprimé quand celui-ci est supérieur à 2.

4. Caractérisation phénotypique des souches (Formation de biofilms)

La capacité des isolats de *F. psychrophilum* à former des biofilms est évaluée en suivant la méthode d'Alvarez et coll., 2006. Brièvement, une colonie des différentes souches de flavobactéries est inoculée dans 20 mL de bouillon FLP et cultivée pendant trois jours à 14 °C sous agitation. La densité optique des différentes suspensions bactériennes est mesurée et ajustée à 0,4-0,6 UA à 590 nm (Dynex Technologies MRX II). Une dilution au 1/100^e est réalisée pour chacune des cultures et 100 µL des inoculums sont déposés *en triplicata* dans les puits d'une microplaque-96 puits (Corning incorporated # 3370). Après une période d'incubation de 3 jours à 14 °C sous agitation, une première lecture de la densité optique à 590 nm (A_{590}) est réalisée. La plaque est ensuite complètement renversée afin d'éliminer le milieu de culture usé et les bactéries en suspension. Elle est rincée trois fois avec de l'eau distillée puis séchée renversée sur papier absorbant afin de chasser toute trace d'eau. Les bactéries adsorbées au fond des puits sont fixées pendant 15 minutes avec 200 µL d'éthanol 100 %. Du cristal violet à 0,1 % (100 µL/puits) est ajouté et, après une incubation de 2 minutes à température ambiante, l'excès de colorant est enlevé à la pipette. Les puits sont à nouveau rincés trois fois avec de l'eau puis séchés comme décrit précédemment. Pour parfaire ce séchage, la plaque est incubée à 37 °C pendant 30 minutes. L'addition de 100 µL d'éthanol 70 % par puits permet de solubiliser le colorant et de réaliser la lecture de la

microplaque à 590 nm. L' A_{590} lue pour chaque puits est proportionnelle au nombre de bactéries qui ont été impliquées dans la formation d'un biofilm au fond du puits.

5. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry et coll., (1951). Dans le cas des protéines membranaires, les extraits sont préalablement dilués dans du SDS à 0,1 % (p/v) (dilutions : 1/50^e et 1/100^e ; 20 minutes, 60 °C) afin de maintenir les molécules en solution (Markwell et coll., 1978). Le contenu polypeptidique des échantillons est évalué par des mesures d'absorbance à 750 nm par rapport à une gamme étalon de sérum albumine bovine (BSA ; de 0 à 40 µg de protéines) réalisée dans les mêmes conditions expérimentales. La concentration en protéines dans l'échantillon est déterminée à partir de la relation suivante :

$$[\text{Protéines}] \text{ (g/L)} = \frac{\text{Quantité équivalent BSA (}\mu\text{g)}}{\text{Volume de l'échantillon (200 }\mu\text{L)}} \times \text{facteur de dilution}$$

En première approximation, le dosage des protéines totales de *F. psychrophilum* a permis d'évaluer la densité des suspensions bactériennes à l'aide de la relation suivante :

$$\text{à } 10^{+9} \text{ bactéries} = 165 \mu\text{g de protéine.}$$

6. Séparation monodimensionnelle des protéines par électrophorèse en présence de SDS

Les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire apparente dans des gels de polyacrylamide contenant du SDS (sodium dodecyl sulfate) selon la technique décrite de (Laemmli 1970). La composition des gels est détaillée dans le Tableau XI.

Les échantillons sont dilués (v/v) dans un cocktail échantillon de charge de composition finale : Tris 60 mM-HCl pH 6,8 ; SDS 1 %, p/v ; glycérol 10 %, (v/v) ; bleu de bromophénol 0,01 %, (p/v) en présence de β mercaptoéthanol à 5 % (v/v) comme agent réducteur des ponts disulfures intra- et inter- moléculaires des protéines. Les échantillons sont chauffés pendant 5 min à 100 °C afin de compléter la dénaturation des protéines. L'électrophorèse est réalisée en tampon de migration (Tris 25 mM-glycine 192 mM, pH 8,3 ; SDS 0,1 %, p/v) sous tension maximale de 220 Volts (15 mA/gel). La masse moléculaire apparente des protéines est évaluée par comparaison avec la migration de marqueurs de masse moléculaire (GE Healthcare AmershamTM).

Après migration SDS-PAGE, les protéines sont fixées et révélées par un mélange d'acide acétique/éthanol/eau (10/50/40, v/v/v) contenant du bleu de Coomassie R-250 à 0,25 % pendant une nuit. L'excès de colorant est éliminé par des lavages successifs des gels dans un mélange d'acide acétique/méthanol/eau (1/1/8, v/v/v). Alternativement, une coloration au nitrate d'argent a été réalisée. Le gel de polyacrylamide est immergé dans un mélange préfixateur 1 (500 mL de méthanol avec 70 mL d'acide acétique et compléter à 1 litre d'eau distillée) pendant 1 heure, puis dans un mélange préfixateur 2 (100 mL de méthanol avec 100 mL d'acide acétique et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée) pendant une heure ou une nuit. Le gel est rincé pendant 5 min sous agitation avec de l'eau distillée, puis fixé 30 min dans un mélange constitué de 66 mL de glutaraldéhyde dans 134 mL d'eau distillée. Le gel est à nouveau rincé 3 fois pendant 15 min sous agitation avec de l'eau distillée, puis ensuite dans une solution éthanolique à 20 %, 2 fois pendant 10 min et puis une heure. Le gel est transféré à l'obscurité dans la solution éthanolique contenant du nitrate d'argent (0,5 g), de la soude (0,4 g) avec 190 mL de solution éthanolique 20 % et d'ammoniaque pur (1 mL). Après trois rinçages à l'obscurité, le profil protéique du gel est révélé par immersion dans une solution de révélation (200 mL d'éthanol à 20 % avec 200 µL de formaldéhyde à 37 % et 50 µL d'acide citrique 2,3 M). La révélation est arrêtée par transfert du gel dans une solution d'inactivation (200 mL de solution éthanolique 20 % avec 2 mL d'acide acétique et 100 µL d'éthanolamine). Pour une bonne conservation des gels, il est possible, après coloration des protéines, de les sécher entre deux feuilles de cellophane. Les feuilles de cellophane sont d'abord humidifiées dans l'éthanol à 20 %, puis le gel est placée entre les deux feuilles et déposé dans le dispositif de séchage (sécheur «gel air dryer» ; Bio-Rad ; 2 heures).

7. Détection des protéines par immunoempreinte (Western Blot)

La technique du Western blot permet la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique à l'aide de sonde(s) immunologique(s) dédiée(s). Les protéines séparées par SDS-PAGE sont électrotransférées sur membrane de nitrocellulose 0,45 µm (Bio-Rad) dans du tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM-glycine 192 mM ; méthanol 20 % v/v ; SDS 0,1 %, v/v) en utilisant l'appareil de transfert (Mini Trans-Blot[®] Cell, Bio-Rad) pendant 2 h à 100 mA constants. Le module de transfert est constitué de : (1) un 1^{er} tampon à récurer de type « Scotch-BriteTM » ; (2) une feuille de papier Whatman n°17 ; (3) le gel de polyacrylamide contenant les protéines séparées ; (4) une membrane de nitrocellulose ; (5) une feuille de papier Whatman n°17 ; et (6) un 2nd tampon à récurer.

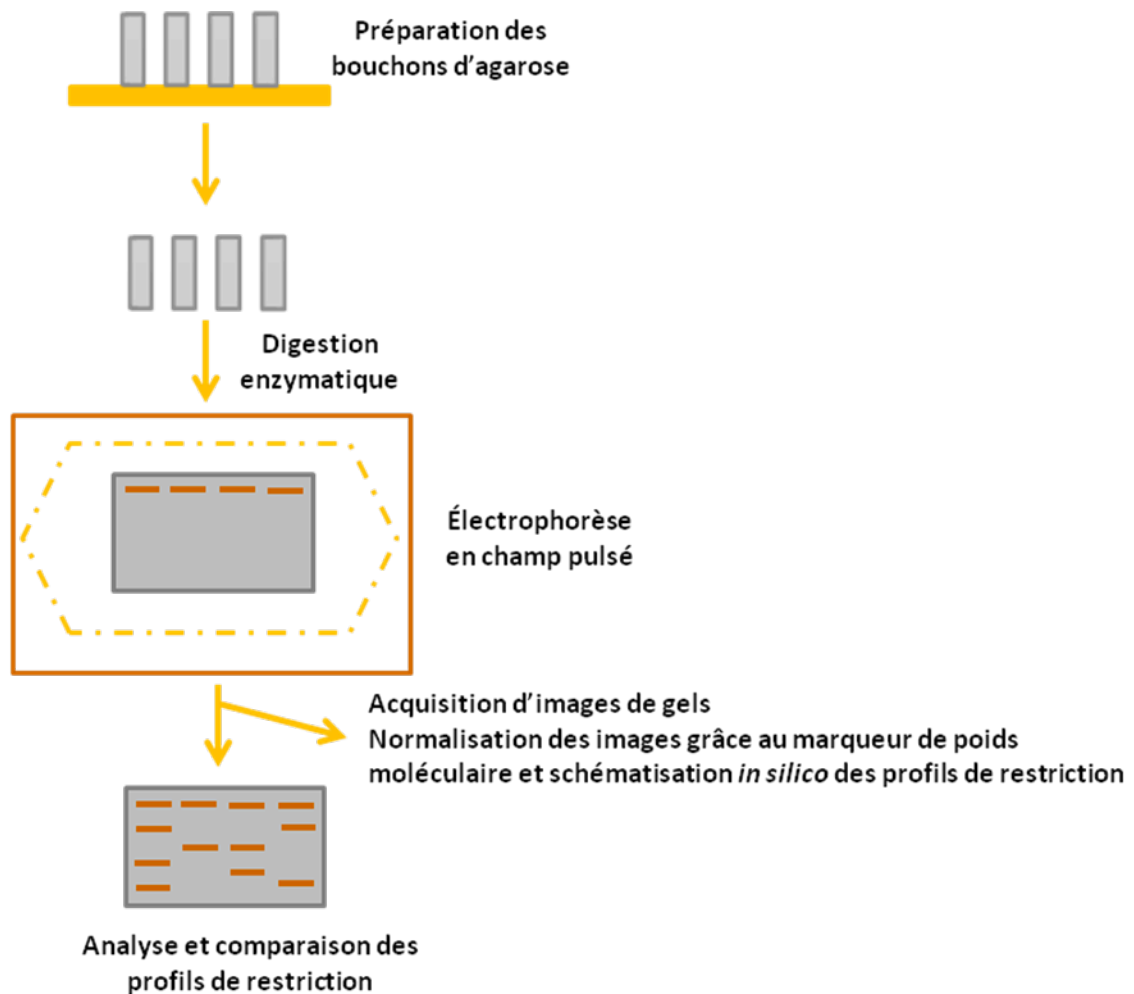


Figure 17. Schéma récapitulatif des différentes étapes de la préparation et de l'analyse PFGE (Siekoula, 2012).

L'efficacité du transfert sur membrane est vérifiée par coloration réversible des protéines au rouge Ponceau S à 0,5 % (p/v) dans une solution d'acide trichloroacétique à 8 % (p/v). Le colorant est éliminé par des rinçages successifs avec de l'eau distillée puis du PBS contenant du Tween 20 à 0,05 %.

Les protéines transférées sont ensuite révélées par la méthode du double marquage immunologique réalisée à température ambiante sous faible agitation. Dans un premier temps, les sites d'adsorption libres de la membrane de nitrocellulose sont saturés avec le tampon de saturation (30 min ; PBS-Tween 20 0,05 %, v/v ; BSA 1 % p/v). Le premier marquage est effectué en présence de sérum de truite convalescente de la flavobactériose dilué au 1/500^e dans le même tampon. Après quatre lavages de 10 min dans du tampon PBS-Tween 20, la membrane est incubée une nuit en présence d'un sérum de lapin immunisé avec des immunoglobulines de truite (= IgM-like ; dilution : 1/2.000^e ; INRA, Jouy-en-Josas). Après une étape de lavage, la membrane est incubée 45 min avec les anticorps secondaires (anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la phosphatase alcaline ; dilution : 1/2.000^e). L'excès d'anticorps est éliminé par quatre lavages de 15 min dans le tampon PBS-Tween 20 et les immunoglobulines fixées sont révélées à l'aide d'un mélange réactionnel de BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt ; 33 µL à 50 mg/mL de DMF, diméthylformamide) et de NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride ; 330 µL à 10 mg/mL de DMF) dans 10 mL de tampon Tris 100 mM (pH 9,4) supplémenté avec du MgCl₂ 100 mM et de NaCl 5 mM. Enfin, la révélation est arrêtée par transfert de l'immunoempreinte dans une solution d'EDTA 5 mM.

8. Analyse PFGE

L'électrophorèse en champ pulsé ou «Pulsed Field Gel Electrophoresis» (PFGE) est une méthode de typage de souches bactériennes qui permet d'associer à chaque souche bactérienne, un profil de restriction ou pulsotype, caractéristique d'une enzyme de restriction donnée. Les étapes de cette technique sont schématisées sur la figure 17 (Siekoula, 2012). L'étude de la variabilité génétique de *F. psychrophilum* à l'échelle d'un poisson, d'un site de production et d'un bassin versant, par la technique PFGE a permis de montrer l'existence d'une variabilité génétique des isolats au niveau de l'individu, voire de l'organe prélevé (Siekoula, 2012). La méthode PFGE a révélé que des truites arc-en-ciel, élevées dans une même zone géographique aux USA et présentant des signes cliniques de la flavobactériose (BCWD), ont été infectées par un ensemble d'isolats de *F. psychrophilum* génétiquement proches (Chen et coll., 2008). Un cas similaire a été observé au Chili, où des

isolats collectés lors de mêmes épisodes cliniques d'infection à la flavobactériose se sont avérés génétiquement proches (Avendano-Herrera et coll., 2009). A l'inverse, il a été montré une diversité intra-populationnelle élevée et des cas de portage de types génétiques différents chez des saumons *coho* pourtant indemnes de signes cliniques (Chen et coll., 2008).

Préparation des "bouchons d'agarose"

Pour chaque isolat à tester, une colonie est repiquée sur gélose FLP et incubée pendant 3 jours à 17 °C. Trois à quatre colonies sont remises en culture liquide (48 heures ; 17 °C). En parallèle, une solution d'agarose est préparée par mélange de 0,21 g d'agarose (concentration à 2 % ; Pulsed Field Certified agarose, Bio-Rad, France) et 9,4 mL de tampon TE (10 mM Tris (Eurobio, France), 1 mM EDTA (VWR, France), pH 8,0) porté à 100 °C. Après dissolution complète de l'agarose, la solution est thermostatée à 55 °C pendant 5 minutes. Ce mélange est supplémenté avec du SDS (0,5 mL de SDS à 20 % ; Bio-Rad, France) pour une concentration finale à 1 % puis, homogénéisé et conservé à 55 °C jusqu'à utilisation. Les bouillons de culture sont centrifugés pendant 5 minutes à 5.000 g, et les culots résultants sont repris dans 2 mL de tampon Cell Suspension (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8.0). Un volume de 400 µL d'une suspension bactérienne ajustée à $A_{625} = 1,2 - 1,8$ est traité avec 20 µL d'une solution de protéinase K à 20 mg/mL puis homogénéisé dans 400 µL de la solution d'agarose thermostatée à 55 °C. Ce mélange est immédiatement réparti dans les moules à bouchon d'agarose à raison de 100 µL par plug. Ceux-ci sont maintenus à température ambiante afin de permettre la solidification.

Lyse des cellules dans les bouchons d'agarose

Les bouchons d'agarose sont immergés dans 5 mL de tampon de lyse (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8,0) contenant du Sarkosyl (Sigma, France) à 1 % et supplémentés avec 25 µL d'une solution de Protéinase K à 20 mg/mL (Promega, France). Les tubes contenant les blocs d'agarose et la solution de lyse sont placés à 37 °C sous agitation (175-200 rpm) pendant 3 heures. Le tampon de lyse est soigneusement éliminé par retournement des tubes sur papier absorbant. Les bouchons d'agarose sont rincés une première fois par agitation pendant quelques secondes dans 15 mL d'eau ultrapure stérile portée à 50 °C, puis incubés pendant 15 minutes dans 15 mL d'eau ultrapure stérile préchauffé à 50 °C. Un dernier rinçage avec 15 mL d'eau ultrapure stérile à 50 °C est réalisé. L'eau est à nouveau soigneusement éliminée par retournement des tubes sur du papier absorbant et 15 mL de

tampon TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) stérile préchauffé sont rajoutés aux bouchons d'agarose. Les tubes sont incubés à 50 °C au bain-marie pendant 15 minutes. Le tampon "TE" est ensuite éliminé et les étapes de rinçage avec le tampon TE sont répétées trois fois. Les bouchons d'agarose sont ensuite égouttés sur du papier absorbant et conservés en tube Eppendorf dans du tampon TE stérile à 4 °C au maximum pendant 1 mois.

Digestion enzymatique

Les bouchons d'agarose soigneusement éponnés sont répartis individuellement dans des tubes Eppendorf (1,5 mL), en présence de 200 µL d'un mélange enzymatique contenant 20 µL de tampon Nebuffer 3 [10X] (New England Biolabs), 2 µL de BSA à 10 µg/µL (New England Biolabs), 3 µL d'enzyme à 10 U/µL (= 40 U/essai) et 175 µL d'eau ultrapure stérile. Les bouchons d'agarose sont ensuite immergés dans la solution enzymatique pour une digestion sur une nuit à 37 °C.

Electrophorèse

Les différents bouchons d'agarose sont déposés dans les puits du gel d'électrophorèse à 1 % (Pulsed Field Certified agarose, Bio-Rad, France). Des marqueurs de poids moléculaire de 24-300 kb (Mid Range II PFGE Marker, New England Biolabs) ont été utilisés pour étalonner l'électrophorégramme. Après scellement des puits avec de l'agarose, la migration est réalisée dans une cuve d'électrophorèse en champ pulsé CHEF-DRII system (Bio-Rad Laboratories), remplie avec 2 L de tampon TBE [0,5X]. La séparation électrophorétique des fragments d'ADN est réalisée à 14 °C pendant 18 heures et 30 minutes ($V = 6 \text{ V/cm}$; pulsation 1-12 sec ; angle de 120 °). En fin d'électrophorèse, le gel est immergé dans une solution de bromure d'éthidium (Eurobio, France) à 0,5 mg/mL pendant 30 min. Le gel est ensuite lavé dans 500 mL d'eau pendant 60 min, puis visualisé sous UV et photographié grâce à une caméra placée dans la chambre UV (appareillages Chemidoc XRS, Bio-Rad, France) gérée par le logiciel Quantity One (Bio-Rad, France).

Les profils PFGE des 55 isolats de *F. psychrophilum* et la souche type JIP 02/86, ont été obtenus au laboratoire Oniris BioEpAR de Nantes, (Ségolène Calvez).

Analyse des résultats

Les profils PFGE ont été analysés à l'aide du logiciel BioNumerics (Applied Maths). Les images des gels d'électrophorèse ont été normalisées après l'identification des bandes de restriction du marqueur de poids moléculaire.

Évaluation de la similarité des profils

La dissemblance entre 2 génotypes est quantifiée par le calcul du coefficient de Jaccard. Il permet d'estimer le degré de diversité de deux profils de restriction (i, j) par le calcul du rapport entre la somme des bandes communes (i, j) et la somme des bandes observées sous les deux profils i et j (Jaccard, 1908). Le coefficient de similarité de Jaccard entre deux profils de restriction i et j est donc calculé comme suit :

$$J_{ij} = \frac{n_{ij}}{n_{ij} + n_i + n_j} \times 100$$

n_{ij} est le nombre de bandes communes entre les deux profils i et j ;

n_i est le nombre de bandes propres au profil i ;

n_j est le nombre de bandes propres au profil j.

Un coefficient de Jaccard égal à 100 % signifie que les profils de restriction sont identiques. Le coefficient de Jaccard entre deux profils est ajusté grâce à des paramètres d'optimisation et de tolérance. La tolérance et l'optimisation ont été fixées ici à 2 %.

Analyse phylogénétique

Les liens de parentés entre les isolats sont établis par construction de dendrogrammes. Ceux-ci sont construits par classification hiérarchique selon la méthode UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean) qui émet l'hypothèse d'une évolution indépendante des différentes lignées à une vitesse constante, avec 1000 répétitions.

Attribution de pulsotype et de cluster

Les différents profils de restriction sont identifiés grâce au seuil de tolérance défini précédemment. Dans notre étude, deux profils lorsqu'ils présentent un maximum de 2 % de différence, sont considérés comme identiques et appartenant au même pulsotype. L'attribution des pulsotypes est réalisée pour l'analyse globale des résultats PFGE sur l'ensemble des isolats issus des sites de l'étude. Les différents pulsotypes sont regroupés dans un même cluster lorsqu'ils présentent une similarité supérieure ou égale à 80 %.

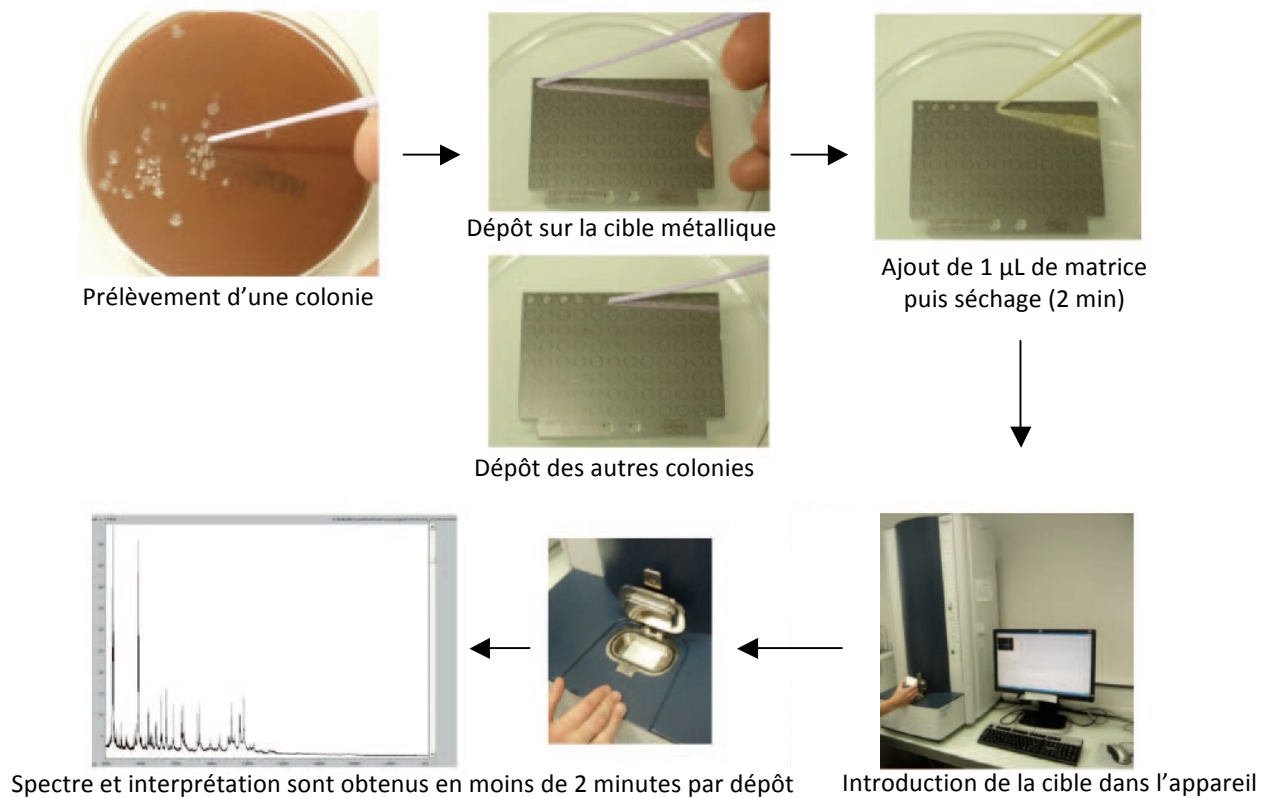


Figure 18. Séquence d'identification par spectrophotométrie de masse de type MALDI-TOF à partir d'une colonie bactérienne dans un laboratoire de microbiologie clinique.

(Photographies : Olivier Gaillot, Laboratoire de bactériologie – hygiène, CHRU de Lille, Blondiaux et coll., 2011).

9. Analyse MALDI-TOF

La désorption-ionisation laser assistée par matrice (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation* ou MALDI) est une technique d'ionisation douce utilisée en spectrométrie de masse, permettant l'analyse de biomolécules (des biopolymères comme les protéines, les peptides et les sucres) et les grosses molécules organiques (comme les polymères, les dendrimères et autres macromolécules) qui tendent à devenir fragiles et à se fragmenter lorsqu'elles sont ionisées par des méthodes plus conventionnelles. Néanmoins, cette méthode d'ionisation est également adaptée à l'analyse de « petites molécules » comme des pesticides, des médicaments ou des lipides. Cette polyvalence, alliée à une rapidité d'exécution et à une relative facilité de mise en œuvre font aujourd'hui du MALDI une technique incontournable en spectrométrie de masse (Figure 18) (Blondiaux et coll., 2011).

Principe

L'ionisation est provoquée par un faisceau laser classiquement à l'azote. Le principe repose sur l'utilisation d'une matrice qui absorbe les rayons ultraviolets, co-cristallisée avec les analytes, et déposée sur une plaque métallique. L'ionisation/désorption est induite par un faisceau de photons issu d'un laser pulsé émettant dans l'ultraviolet. Le composé à analyser est instantanément transféré en phase gazeuse et ionisé. Les ions majoritairement formés en MALDI sont des ions monochargés, le plus souvent, en mode d'ionisation positif. Il s'agit de molécules protonées ou cationisées.

L'échantillon est mélangé à la matrice et placé sur une lame. Le dépôt formé est appelé cible. Une source laser est dirigée sur la cible afin d'ioniser les molécules de l'échantillon. Les ions sont alors détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge. Les molécules plus grandes mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules plus petites arriveront plus vite. Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme de spectre.

Préparation de la matrice et dépôt de l'échantillon

La solution extemporanée de matrice se compose de 200 à 500 μL de 50 % (v/v) acétonitrile, 2,5 % (p/v) de trifluoro d'acide acétique dans laquelle quelques cristaux de 4 α -hydroxy acide cinnamique vont saturer la solution. La solution est centrifugée pendant 1 min à 6.000 x g. Un μL de l'échantillon est déposé trois fois sur la plaque cible à 96 ou 384 dépôts

Tableau XII.

Interprétation des valeurs de score de concordance des spectres obtenus à partir d'une bactérie d'intérêt avec ceux de la base de données, reflétant le degré de confiance à accorder à l'identification par l'analyse MALDI-TOF.

Valeur	Description	Symbole	Couleur
2.300 ... 3.000	forte probabilité d'identification à l'espèce	(+++)	vert
2.000 ... 2.299	identification du genre sécurisée, identification à l'espèce probable	(++)	vert
1.700 ... 1.999	identification au genre probable	(+)	jaune
0.000 ... 1.699	degré de confiance insuffisant pour l'identification	(-)	rouge

en acier et laissé sécher à l'air libre. Le dépôt d'échantillon est finalement recouvert avec 1 μL de la solution matrice et à nouveau laissé à sécher. Il est nécessaire de travailler rapidement pour éviter les risques d'oxydation de l'analyte pouvant conduire à une modification des pics, surtout avant l'addition de la solution matrice.

La méthode de dépôt sélectionnée est la méthode de la goutte séchée sur une cible Anchor-ChipTM (284-400 μm) (Bruker Daltonics). Le dépôt de l'échantillon est réalisé sur la matrice cristallisée. Différents modes de séchage, 20 minutes à température ambiante, 5 minutes à l'étuve à 35 °C et 30 secondes dans une cloche à vide, ont été testés afin d'observer leur influence sur la qualité et la rapidité de la cristallisation.

Le dépôt doit être aussi régulier que possible. Des variations de l'épaisseur, dues à des irrégularités de surface, modifient la distance entre le plan du dépôt et la première grille d'extraction, ce qui provoque des variations de temps de vol des ions. Le même phénomène engendre des défauts de calibration externe ou pseudo-interne au dépôt.

Analyse et l'interprétation

Les analyses ont été faites sur un instrument UltraflexTM (Bruker Daltonics). Un standard interne a été utilisé à chaque dépôt pour la calibration de l'appareil. Les valeurs de masse pour chaque pic détecté à un temps de vol donné ont été attribuées grâce au logiciel X-MASSTM (Bruker Daltonics). Cette fonction calcule la masse de l'entité détectée selon la position des 10 % de la partie supérieure du pic qu'elle engendre. Afin de déterminer les fenêtres de lecture des temps de vol de chaque produit, les valeurs de masses attendues ont été comparées aux valeurs de masses observées afin d'intégrer la déviation standard de la masse observée pour chaque produit. Pour chaque interprétation, les spectres générés à partir de colonies isolées sont comparés à ceux de la base de données Biotyper fournie avec l'équipement. La concordance d'un spectre obtenu à partir d'une bactérie étudiée avec ceux des souches de référence est traduite par un score qui indique le degré de confiance à accorder à l'identification (Tableaux XII). Les spectres des différents isolats ont été obtenus au LPL site de Mont-de-Marsan (Patrick Daniel).

III. EXPRESSION DES RÉSULTATS ET TRAITEMENTS STATISTIQUES

Toutes les analyses portant sur une évaluation quantitative sont réalisées *en triplicata*. Les résultats obtenus sont exprimés par la valeur moyenne \pm la déviation standard. Les analyses statistiques des données sont réalisées par une analyse de variance à un facteur

"one-way ANOVA" en utilisant le programme GraphPad Prism version 4.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). En fonction des expériences, les analyses statistiques sont effectuées après transformation ou non des données (racine carrée, \log_{10}) et les comparaisons réalisées en utilisant les tests les plus appropriés (Bonferroni, Dunnet ou Tukey). Les résultats expérimentaux sont considérés statistiquement significatifs lorsque les valeurs de P (significativité de la variance) sont inférieures à 0,05 ($p < 0,05$). Par ailleurs, la méthode de Kaplan-Meier a été mise en oeuvre pour analyser la survie des poissons en fonction du temps au cours des essais de vaccination.

CHAPITRE III

DÉTECTION ET CARACTÉRISATION PRÉCOCE

DE L'INFECTION À *FLAVOBACTERIUM*

***PSYCHROPHILUM* CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL**

1. Introduction

Depuis une vingtaine d'années, *F. psychrophilum* est retrouvé dans toutes les régions dans lesquelles il existe une activité salmonicole (Europe, Amérique, Asie du Nord-Est et Océanie). La suspicion d'un transfert vertical, c'est-à-dire la contamination des élevages *via* le portage de la bactérie *in ovo*, met en cause le commerce international des œufs. Dans un premier temps, le diagnostic de la flavobactériose peut être réalisé par l'observation des signes de la maladie. Malheureusement, le bilan clinique traduit souvent un stade avancé des dommages causés par l'agent pathogène, stade à partir duquel aucun traitement n'est plus efficace. De plus, la confirmation du diagnostic par des examens de laboratoire reste nécessaire. Il s'agit en particulier d'isoler *F. psychrophilum* sur un milieu de culture spécifique et/ou de réaliser des observations au microscope photonique à partir d'organes de poisson prélevés. La visualisation de bacilles fins et flexueux dans des échantillons de rate ou parfois de rein, ainsi que l'examen sur gélose de colonies jaunes et convexes qui apparaissent au bout de trois jours après incubation des boîtes à une température de 15-20 °C, permettent de confirmer ou d'infirmer un premier diagnostic (Holt et coll., 1993).

Différents outils pour détecter et identifier *F. psychrophilum* ont été développés parmi lesquels des essais infructueux de culture en boîte de Petri sur milieu dédié, l'analyse immuno-chimique (i) à l'aide d'anticorps couplés à de la fluorescence (Madetoja et coll., 2002 ; Vatsos et coll., 2006), (ii) par immunomarquage sur colonies (Misaka et coll., 2008), (iii) par test « ELISA » (Lindstrom et coll., 2009) ou (iv) par une méthode combinant la cytométrie de flux après séparation immunomagnétique (Hibi et coll., 2008 ; Ryumae et coll., 2010). Ces techniques conventionnelles mises en œuvre pour détecter *F. psychrophilum* en routine sur les échantillons de poissons ne sont pas suffisamment rapides ni sensibles. L'approche PCR est devenue depuis plus de 10 ans, la méthode de choix pour détecter les agents pathogènes viraux ou bactériens en raison de sa rapidité, sa sensibilité et sa spécificité. Ainsi, de nombreuses techniques PCR ont été décrites pour détecter *F. psychrophilum* (Urdaci et coll., 1998 ; Wiklund et coll., 2000 ; Cepeda et coll., 2000 ; Altinok, 2011). En raison de la faible présence de la flavobactérie dans les échantillons de poissons infectés, des stratégies de PCR nichées (« Nested PCR ») ont été développées. Plusieurs cibles ont été envisagées ; la première est une séquence du gène qui code la sous-unité 16S des ARN ribosomiques (Baliarda et coll., 2002) alors que d'autres sont des séquences des gènes *gyrA*, *gyrB*, *ppiC* ou *parE* qui codent deux sous-unités de la gyrase, la peptidylprolyl cis-trans-isomérase C ou la sous-unité B de l'ADN topoisomérase IV, respectivement (Izumi et coll., 2003 ; Suzuki et coll., 2008). Afin d'abaisser encore le seuil de détection, différentes

approches qPCRs ont été mises en œuvre pour évaluer l'infection des poissons à *F. psychrophilum*. L'équipe de Guijarro a développé la première une qPCR TaqMan qui cible un fragment de gène codant les ARNr 16S. En raison de la taille exagérément importante du fragment amplifié (= 972 pb), il ne s'agit pas à proprement parlé d'une PCR en temps réel mais plus d'une PCR en point final. Il est en effet nécessaire de réaliser en fin de qPCR, une étape de vérification de la taille du fragment amplifié par électrophorèse en gel d'agarose afin de confirmer la spécificité de l'amplification (Del Cerro et coll., 2002b). Aussi, notre équipe avait cherché à mettre au point une qPCR SybrGreen fondée sur l'utilisation de deux amorces qui ciblent le gène *adnr16S* permettant l'amplification d'un fragment de 147 pb (Orieux et coll., 2011). La taille du produit d'amplification obtenu est compatible avec la mise en œuvre d'une qPCR réellement quantitative qui montre une grande spécificité vis-à-vis de sa cible dans une gamme de 11 copies à 4×10^8 copies du gène par réaction. Cette méthode permet de quantifier l'infection à *F. psychrophilum* dans des tissus de poissons malades. Dans la mesure où le séquençage du génome de la flavobactérie a mis en évidence la présence de six copies du gène *adnr16S* (Duchaud et coll., 2007), une limite de détection a été proposée qui correspond à deux bactéries par mg de tissu infecté (Orieux et coll., 2011). Si ce test de détection est bien plus sensible que le test de Del Cerro, il s'avère néanmoins moins spécifique car générant un certain nombre de « faux-positifs » ce qui fait obstacle à une utilisation en routine par des Laboratoires d'Analyses Vétérinaires. De plus, il ne permet la mesure du taux d'infection d'un tissu de poisson que par rapport à la pesée, forcément peu précise, de l'échantillon analysé. Plus récemment à l'aide de serveur de recherche de signatures d'ADN uniques (« Insignia » ; Phillippy et coll., 2009) et de développement d'amorces, l'équipe de Wiens a identifié une séquence conservée « simple copie » spécifique au génome de *F. psychrophilum* et qui code une protéine hypothétique de fonction inconnue (Marancik et coll., 2013). Les amorces et la sonde TaqMan proposées ont permis l'amplification d'un fragment de 220 pb sur un jeu de 210 isolats de *F. psychrophilum* avec une limite de détection de trois équivalents génomes par réaction.

En raison de la présence des six copies du gène codant l'ARNr 16S dans le chromosome de *F. psychrophilum*, nous avons estimé que ce gène restait une cible de choix dans un test de détection qPCR afin d'abaisser, autant que faire se peut, le seuil de sensibilité. Aussi, nous avons cherché à développer un nouveau test suffisamment sensible et spécifique pour qu'il puisse être utilisé en diagnostique de routine. Dans un premier temps, il s'agissait d'apporter de la spécificité à la méthode décrite par Orieux et coll (2011) en (i) revisitant les amorces proposées initialement et (ii) en définissant une nouvelle sonde TaqMan. Dans un deuxième

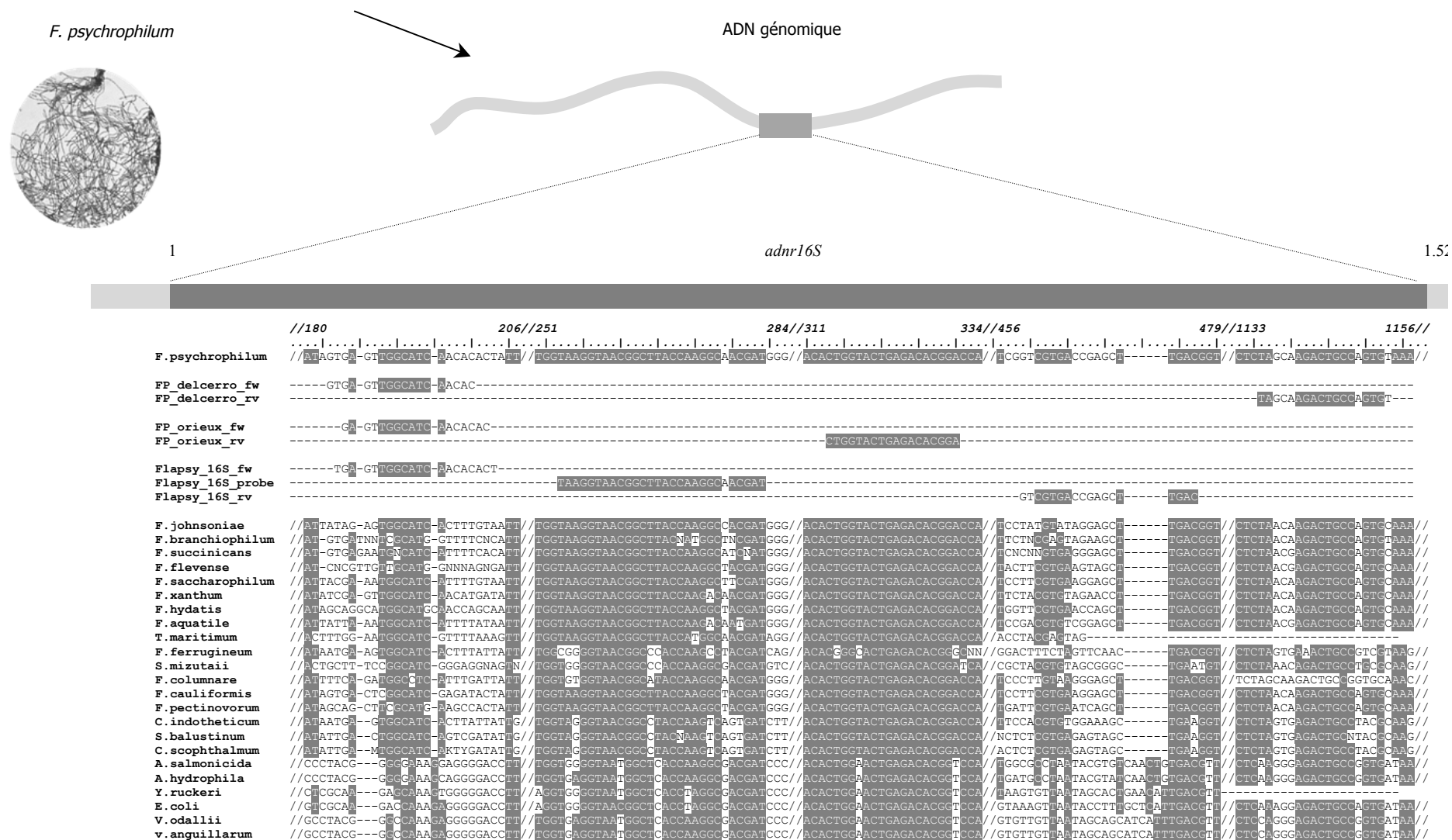


Figure 19. Analyse comparative des séquences des gènes que codent l'*adnr 16S* de *F. psychrophilum* JIP02/86 avec celles d'autres flavobactéries ou autres pathogènes de poissons.

Les amorces FP_delcerro, FP_orieux et Flapsy sont celles décrites par Del Cerro et coll., (2002), Orioux et coll., (2011) ou développées au cours de cette thèse, respectivement. Les lettres grisées mettent soulignent les bases conservées dans les différents gènes *adnr 16S* analysés.

temps, il était souhaitable de s'affranchir des biais de pesée de l'échantillon biologique liés à sa très petite taille et sa teneur en eau variable, ainsi que de l'efficacité d'extraction de l'ADN du tissu analysé. Aussi, nous avons développé un système duplex qui permet d'amplifier un second gène cible (= *β-actine*) présent dans le génome de la truite arc-en-ciel. Au cours d'un même cycle d'amplification, il est alors possible de déterminer le taux d'infection du tissu analysé après calcul du rapport entre le nombre de copies d'*adnr16S* *F. psychrophilum* et celui de *β-actine* de la truite arc-en-ciel. L'outil développé a permis d'identifier comme « *F. psychrophilum* » un certain nombre de souches fraîchement isolées de sites piscicoles du Sud-Ouest. Les relations génotypiques éventuelles entre les différentes souches ont été étudiées par PFGE.

2. Matériel et méthodes spécifiques

a. Dessin des jeux d'amorces et sondes spécifiques de *F. psychrophilum* ou de la truite pour le développement d'une qPCR TaqMan

Comme indiqué précédemment, la séquence du gène *adnr16S* de *F. psychrophilum* a été choisie pour cible afin d'optimiser la sensibilité du test qPCR. Dans un premier temps, un travail d'alignement exhaustif de séquences d'*adnr16S* a été réalisé avec l'algorithme ClustalW à partir de la souche type JIP02/86 de *F. psychrophilum* avec différentes espèces du genre *Flavobacterium* et d'autres agents pathogènes de poissons (Figure 19) : *F. psychrophilum* (AM398681), *F. branchiophilum* (D14017), *F. columnare* (AB023660), *F. pectinovorum* (AM921624), *F. johnsoniae* (CP000685), *F. saccharophilum* (D12671), *F. succinicans* (D12673), *F. flevense* (D12662), *F. hydati* (D12656), *F. aquatile* (M62797), *S. mizutaii* (NR_115496.1), *F. xanthum* (AJ601392), *Sporocytophaga cauliformis* (AY550033), *Tenacibaculum maritimum* (AM850059), *Terrimonas ferruginea* (M62798), *Chryseobacterium indoltheticum* (AY468448), *Chryseobacterium balustinum* (M58771), *Chryseobacterium scophthalmum* (NR_025386), *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (CP000644), *Aeromonas hydrophila* (NR_043638), *Yersinia ruckeri* (AJ289197), *Escherichia coli* (HG738867), *Vibrio ordalii* (EU107976), *Vibrio anguillarum* (KF306281). A partir de ces séquences, une paire d'amorces et une sonde spécifiques de *F. psychrophilum* ont été dessinées (Figure 19) :

```

//1682                                1705//1735                                1785//
O.mykiss (AJ438158.1) //GCAGCCTTAA-GTCTTGGTCCTGTA//TTG-AACCCGAGTGTGACCTCTGCTGG-----GGGGGGTCAAGGTGATTAGGGTGCC//
O.mykiss (NM_001124235.1) //GCAGCCTTAA-GTCTTGGTCCTGTT//TTG-AACCCGAGTGTGACCTCTGCTGG-----GGGGGGTCAAGGTGATTAGGGTGCC//
S.salar (BT059604.1) //GCAGCCTTAAAGTCTTGGTCCTGTT//TTGAAACCCAGTGTGACCTCTGCTGGATTGGGGGGGGTCAAAGTTGATTAGGGTGCC//
S.salar (BT045109.1) //GCAGCCTTAAAGTCTTGGTCCTGTT//TTGAAACCCAGTGTGACCTCTGCTGGATTGGGGGGGGTCAAAGTTGATTAGGGTGCC//
Esox lucius (GATF01022074.1) //GCAGCCTTAAAGTCTTGGTCCTGTT//TTG-AACCTGAGCGTGACCTCTGCTTGGTTGTTCT-GGGTCAAGGTGAGT-GGGGGCC//
Om_ActB_1682_fw -----CAGCCTTAA-GTCTTGGTCCTG-----//
Om_ActB_1736_probe -----//-----AACCCGAGTGTGACCTCTGCTGG-----
Om_ActB_1783_rv -----//-----GTCAGAGGTGATTAGGGTGCC-----

```

Figure 20. Analyse comparative des séquences du gène β -actine de différentes espèces de poissons d'élevage (truite arc-en-ciel, saumon de l'Atlantique, brochet).

Les séquences alignées sont les seules portions 3' terminales d'ARNm de β -actine ayant une homologie avec les amorces ciblant la β -actine de truite. Les amorces Om_ActB et la sonde spécifiques du gène β -actine de la truite arc-en-ciel sont en gras soulignées. Les lettres grisées indiquent les bases conservées dans les différents gènes analysés.

- Flapsy_16S_fw (5'-TGAGTTGGCATCAACACACT-3')
- Flapsy_16S_rev (5'-GTCAAGCTCGGTCACGAC-3')
- Flapsy_16S_probe [5'-(FAMTM)-TAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGAT-(TAMRATM)-3'].

Les amorces et la sonde qui ciblent le gène codant la *β-actine* ont été dessinées à partir de la séquence du gène *β-actine* de truite arc-en-ciel disponible sur *GenBank* (Figure 20). Elles ont été dessinées en utilisant le logiciel Perlprimer qui permet de limiter la formation de dimères d'amorces toujours possible. Une analyse BLAST a permis de s'assurer de l'absence probable d'hybridation non spécifique. Les séquences suivantes ont été proposées pour les amorces :

- Om_actB_fw (5'-CAGCCTTAAGTCTTGGTCCTG-3')
- Om_actB_rev (5'-GCACCCTAATCACCTCTGAC-3')]
- La sonde Om_actB_probe [5'-(HEXTM ou VICTM)-ATGAACCCGAGTGTGACCTCTGCTG-(TAMRA)-3'] (Figure 20).

Les molécules fluorescentes liées à la sonde ont été HEXTM ou VICTM en fonction du thermocycleur utilisé, Mx3000PTM à Bordeaux Sciences Agro ou StepOnePlusTM au Laboratoire des Pyrénées et des Landes de Mont-de-Marsan, respectivement.

b. Tests de spécificité des amorces et de la sonde Flapsy_16S

La spécificité des amorces et de la sonde a été réalisée sur la base d'un rapport déterminé entre (i) le nombre de copies d'*adnr16S* obtenu sur un échantillon bactérien donné à l'aide des amorces et sonde Flapsy_16S et (ii) celui déterminé avec les amorces universelles 16S_338_fw (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCA-3') et 16S_503_rev (5'-CTGCTGGCACGGAGTTAGC-3'). L'amplification a été réalisée par qPCR TaqMan avec les amorces et sonde Flapsy_16S ou par qPCR SybrGreen avec les amorces universelles comme décrit par Orioux et coll. (2011). Un standard de quantification des copies du segment *adnr16S* spécifique et de celles du segment *adnr16S* non-spécifique de *F. psychrophilum* a été utilisé. Il a été créé à partir de l'amplifiat obtenu avec le couple d'amorces FP_delcerro (972 pb). Une copie de l'amplifiat est insérée dans un vecteur de clonage (pGEM-T) pour donner un plasmide pGEM-T_Fp.

c. Mise au point de la qPCR TaqMan en duplex *adnr16S* de *F. psychrophilum* / β -actine de la truite

Après une première phase de mise au point, les conditions optimisées pour réaliser l'analyse qPCR TaqMan ont été les suivantes : tampon Brilliant III de Agilent, ROX 30 nM ; Flapsy_16S_fw 200 nM ; Flapsy_16S_rev 300 nM ; Flapsy_16S_probe 250 nM ; Om_actB_fw 50 nM ; Om_actB_rev 50 nM ; Om_actB_probe 200 nM ; 2 μ L de matrice ; eau milliQ stérile qsp 12 μ L. La quantification est réalisée grâce au standard pGEM-T_Fp décrit précédemment. Un 2^e standard de quantification des copies du segment du gène codant la β -actine de truite a été créé à partir de l'amplifiat obtenu avec le couple d'amorces (Om_actB ; 101 pb) puis inséré dans un vecteur de clonage pour donner le plasmide pGEM-T_Om. Les préparations des plasmides recombinants ont été dosées par spectrophotométrie UV, diluées en série au 1/10^e puis testées par qPCR TaqMan. La réaction de qPCR TaqMan simplex ou duplex est réalisée dans un thermocycleur MX3000PTM (Agilent technologies) en utilisant la programmation suivante : une première étape de dénaturation de l'ADN (3 min à 95 °C) puis une deuxième étape d'amplification de 40 cycles composés de : 20 sec de dénaturation de l'ADN à 95 °C et 1 min d'hybridation/extension des amorces sur l'ADN cible à 60 °C. A chaque fin de cycle, la mesure de l'intensité de la fluorescence (IF en fonction du fluorophore utilisé ; λ_{ex} = 535 nm / $\lambda_{ém}$ = 555 nm pour HEX ; λ_{ex} = 492 nm / $\lambda_{ém}$ = 516 nm, FAM ; λ_{ex} = 538 nm / $\lambda_{ém}$ = 554 nm pour VIC) du mélange réactionnel est enregistrée puis représentée sous la forme d'une courbe IF = f(cycles) classiquement de forme sigmoïde. Pour toutes les courbes d'amplification, un seuil est fixé de façon à ce qu'il coupe la courbe d'amplification au début de la phase exponentielle d'augmentation de fluorescence. Le cycle correspondant à l'intersection de ce seuil et de chaque courbe d'amplification est appelé « threshold cycle » (C_t), ou cycle seuil. Les analyses d'optimisation et de validation ont été réalisées *en triplicata* afin de s'assurer d'une bonne reproductibilité. Ultérieurement, les expériences de quantification de routine ont été effectuées *en duplicata*.

d. Détermination des limites de quantification

Pour évaluer l'éventuel impact négatif de la co-amplification des gènes *adnr16S* et β -actine au cours de la qPCR TaqMan duplex, une gamme de dilution au 1/10^e d'une suspension bactérienne de *F. psychrophilum* (A_{600} = 0,5) a été réalisée dans une solution d'ADN de truite obtenue après extraction de 10 mg de rate (poids humide ; équivalent 50 μ g de rate/ μ L). Les dilutions obtenues ont été essayées comme matrice d'une qPCR TaqMan duplex. Une gamme de « témoins négatifs » a été préparée à partir de dilutions de la même

suspension bactérienne dans de l'eau stérile. Le nombre de copies d'*adnr16S* présentes dans chacune des dilutions a été déterminé *en triplicata* par qPCR TaqMan simplex afin de s'affranchir (i) de l'impact négatif toujours possible de la co-amplification *adnr16S*/ β -actine et (ii) de la présence éventuelle d'inhibiteurs issus de l'extraction d'ADN de truite à partir de l'échantillon de rate. L'efficacité de l'amplification *adnr16S*, la limite de détection et la gamme dynamique de la quantification ont été évaluées.

3. Résultats et Discussion

a. Validation des amorces et des sondes pour la qPCR TaqMan duplex *adnr16S* de *F. psychrophilum* / β -actine de truite arc-en-ciel

Sur les bases de données *GenBank*, les séquences des gènes qui codent la sous-unité 16 S des ARN ribosomiques chez différentes bactéries appartenant au genre *Flavobacterium* ont été comparées *in silico* avec celles d'autres bactéries à l'aide de l'algorithme BLAST (Figure 19). Deux segments présentant un faible score d'alignement ont été bien identifiés permettent de dessiner une paire d'amorces potentiellement hautement spécifiques de *F. psychrophilum* ainsi que la sonde TaqMan. L'amorce Flapsy_16S_fw diffère peu de celles décrites par Del Cerro et coll. (2002a) ou d'Orieux et coll. (2011), (FP_delcerro_fw et FP_orieux_fw, respectivement). En revanche, l'amorce Flapsy_16S_rev est localisée dans une zone bien plus spécifique que ne l'est l'amorce FP_orieux_rev, mais également plus proche de l'amorce « sens » que l'amorce FP_delcerro_rev de telle sorte que l'amplifié généré ait une taille plus faible (292 pb vs 972 pb) bien plus compatible avec la mise en œuvre d'une qPCR. Les amorces Flapsy_16S n'offrent d'homologie satisfaisante qu'avec les séquences *adnr16S* présentes dans le génome de l'espèce *psychrophilum* mais également sur cinq accessions *Flavobacterium* spp. (AJ319022.1, AJ319023.1, AJ319013.1, AJ319012.1 et AJ319011.1) dont les séquences présentent de très fortes homologues avec l'espèce *F. psychrophilum*. Très probablement, les souches non formellement identifiées appartiennent à cette espèce. La sonde Flapsy_16S_probe s'apparie sur un segment du gène *adnr16S* moins spécifique de l'espèce *psychrophilum*. Un travail analogue a été réalisé afin de dessiner les amorces et la sonde Om_actB qui ciblent le gène codant la β -actine chez la truite arc-en-ciel (Figure 20). Il n'a pas été mis en évidence de site potentiel d'hybridation, autre que ceux ciblant le gène β -actine, susceptible de gêner la qPCR.

La spécificité des amorces Flapsy_16S pour la qPCR TaqMan a été essayée sur un panel représentatif de souches bactériennes préalablement caractérisées *F. psychrophilum* par la

Tableau XIII.
Liste des souches bactériennes utilisées pour réaliser
le test de spécificité de la qPCR en duplex *F. psychrophilum* β -actine.

Espèces	Souche bactérienne	Source	Facteur de spécificité (moyenne \pm SD)
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	JIP 02/86	INRA	1,30 \pm 0,52
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	G4	BSA	5,42 \pm 0,14
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	F6	BSA	3,18 \pm 0,21
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	P0388	BSA	3,08 \pm 0,11
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	H4 SAP M	LPL	4,90 \pm 0,17
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	NCIMB 1947	NCIMB	0,44 \pm 0,53
<i>Flavobacterium psychrolimnae</i>	108326	Pasteur	(8,00 \pm 11,04) $\times 10^{-5}$
<i>Flavobacterium frigidarium</i>	107124	Pasteur	(1,87 \pm 2,69) $\times 10^{-5}$
<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	FL15	INRA	(1,69 \pm 2,59) $\times 10^{-5}$
<i>Flavobacterium hydatis</i>	104741	Pasteur	(7,33 \pm 11,25) $\times 10^{-7}$
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	100931	Pasteur	(2,06 \pm 3,04) $\times 10^{-7}$
<i>Flavobacterium columnare</i>	103531	Pasteur	0
<i>Listeria innocua</i>		BSA	(3,07 \pm 4,41) $\times 10^{-7}$
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	ISB06	Cobiotex	(1,69 \pm 2,41) $\times 10^{-7}$
<i>Serratia liquefaciens</i>	6603.1	LPL	(1,35 \pm 2,01) $\times 10^{-7}$
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	Cb 1996-08	LPL	(1,40 \pm 2,08) $\times 10^{-8}$
<i>Yersinia ruckeri</i>	1884-07	LPL	0
<i>Escherichia coli</i>	S17-1	USA	0
<i>Aeromonas salmonicida</i>	AU-3103	Chili	0
<i>Pediococcus acidilactici</i>	M18/5M	Lallemand	0
<i>Vibrio anguillarum</i>	AU-1410	Chili	0

BSA : Bordeaux Sciences Agro
Cobiotex : Filiale du groupe Doxal
INRA : Institut Nationale de la Recherche Agronomique
Lallemand : Société
LPL : Laboratoire des Pyrénées et des Landes
NCIMB : Collection de souches.

communauté scientifique (Tableau XIII), dans un premier temps par PCR classique en point final (données non montrées) puis, dans un second temps, par qPCR en déterminant pour chaque souche bactérienne testée, un facteur de spécificité. Brièvement, le nombre de copies *adnr16S* est déterminé comme décrit dans « Matériel et Méthodes » par (i) qPCR TaqMan à l'aide des amorces spécifiques Flapsy_16S et (ii) par qPCR SybrGreen avec les amorces universelles. Le rapport de spécificité calculé est « proche » de 1 (entre 0,44 à 5,42 pour les souches consignées dans le Tableau XIII) lorsque les bactéries sont certifiées *Flavobacterium psychrophilum* alors qu'il est nul ou très faible ($< 10^{-4}$) pour les bactéries qui appartiennent à d'autres genres ou espèces bactériennes. Cette analyse souligne la pertinence des amorces et de la sonde Flapsy_16S pour identifier et quantifier des souches bactériennes *F. psychrophilum* même lorsque celles-ci peuvent être éloignées de la souche de référence car isolées d'un organisme hôte autre que la truite arc-en-ciel ou avoir évoluées depuis la date de son isolement en raison des probables nombreux repiquages. C'est le cas de la souche NCIMB 1947 isolée en 1955 à partir d'un saumon *coho* (Bernardet et coll., 1996). De plus, les très faibles facteurs de spécificité obtenus pour les flavobactéries n'appartenant pas à l'espèce *psychrophilum* suggèrent une réelle amplification d'*adnr16S* mais avec des signaux qPCR insuffisants pour conduire à la détection de faux-positifs. C'est particulièrement le cas des souches appartenant aux espèces *psychrolimnae*, *frigidarium* ou *branchiophilum*.

b. Sensibilité du test qPCR TaqMan *in vitro*

L'efficacité et de la reproductibilité du test qPCR TaqMan duplex *adnr16S*/ β -actine ont été estimées sur la base de l'analyse de plusieurs courbes standards d'amplification réalisées indépendamment les unes des autres (cinq expériences, jours et lot de tampons différents) en présence des plasmides standards pGEM-T_Fp ou pGEM-T_Om. Les courbes obtenues soulignent la linéarité du dosage des copies des gènes *adnr16S* et β -actine dans une gamme d'au moins six \log_{10} (Figure 21). Cette linéarité est observée dans le cas du gène *adnr16S* de *F. psychrophilum* pour un nombre de copies compris entre $2,4 \times 10^7$ (point maximal essayé) et 24 copies. En raison des six copies du gène *adnr16S* présentes dans le génome de *F. psychrophilum*, cette limite inférieure correspond à un seuil minimal de détection théorique de quatre bactéries par réaction qPCR TaqMan. Dans le cas de l'amplification du gène β -actine, la gamme linéaire d'amplification est comprise entre $2,9 \times 10^7$ à 29 copies. A l'intérieur des gammes de linéarité, les coefficients de variation enregistrés pour les courbes d'étalonnage sont compris entre [0,69 % ; intrarun - 2,57 % ; interrune] pour le gène

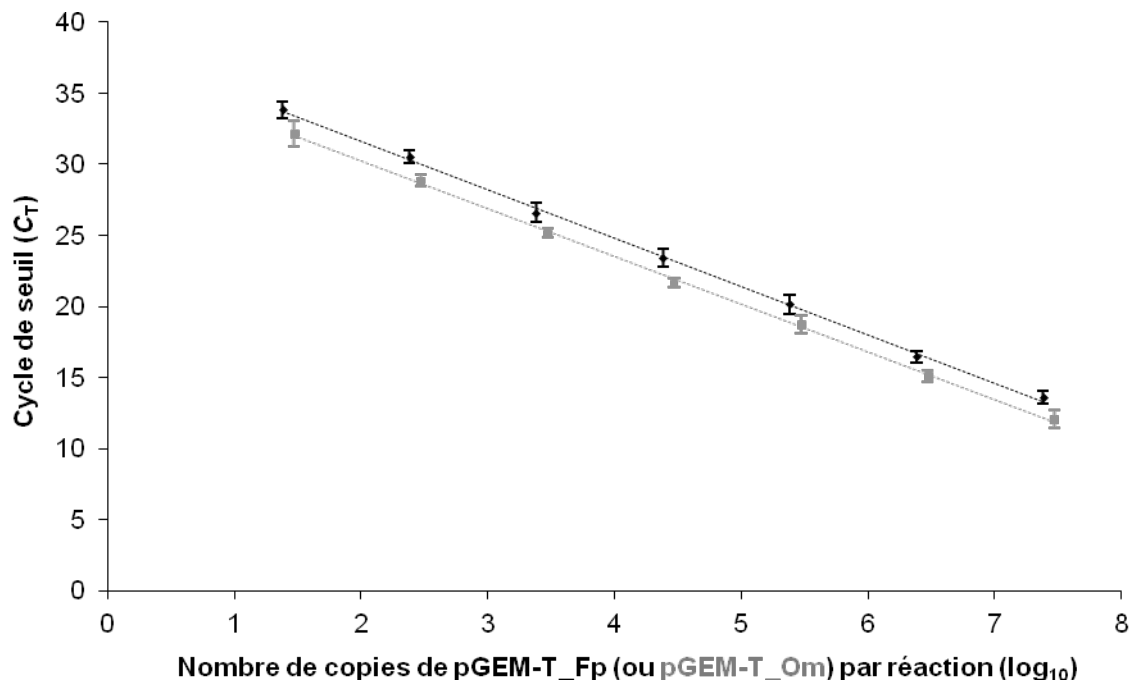


Figure 21. Courbes de calibration qPCR TaqMan en duplex *adnr 16S* de *F. psychrophilum* / *β-actine* de truite.

La sensibilité de la qPCR a été testée pour la détection spécifique simultanée de *F. psychrophilum* (◆) et de la truite arc-en-ciel (■). Les plasmides pGEM-T_Fp et pGEM-T_Om ont été utilisés comme standards dans un ratio (1:1). Portent une copie unique du fragment de 292 pb spécifique du gène codant l'*adnr 16S* de *F. psychrophilum*, ou une copie unique du fragment de 145 pb spécifique du gène *β-actine* de la truite arc-en-ciel, respectivement. Les essais de qPCR TaqMan en duplex ont été réalisés en utilisant un mélange des amorces [(i) Flapsy_16S_fw / Flapsy_16S_rev et (ii) Om_ActB_fw/Om_ActB_rev] et des sondes [(i) Flapsy_16S_probe et (ii) Om_ActB_probe]. Les points expérimentaux figurés représentent la moyenne des cycles de seuil (C_T) d'échantillons obtenue à partir de cinq expériences distinctes. Les barres d'erreurs correspondent aux écart-types.

adnr16Set [1,22 % - 2,58 %] pour le gène *β-actine*. Les efficacités moyennes des amplifications *adnr16S* /*β-actine* sont de $96,8 \pm 4,0$ % et $98,9 \pm 4,9$ %, respectivement.

c. Sensibilité du test qPCR TaqMan *in vivo*

Dans les échantillons biologiques de truites infectées par *F. psychrophilum*, la quantité d'*adnr16S* recherchée est toujours très faible en comparaison avec celle de *β-actine* présente dans les cellules de l'hôte analysées. Il est donc possible que l'amplification de *β-actine*, cible très abondante dans l'échantillon, ait un impact négatif sur l'amplification d'une séquence d'ADN de *F. psychrophilum* recherchée à l'état de traces. Par ailleurs, il est bien connu que malgré la qualité des kits d'extraction d'ADN, il n'est pas possible d'exclure la présence d'inhibiteurs de la qPCR au cours de la préparation de l'échantillon. C'est pourquoi, il était nécessaire d'évaluer les effets d'une charge importante d'ADN issue d'un échantillon de rate de truite sur la linéarité du dosage du nombre de copies d'*adnr16S* porté par le plasmide pGEM-T_Fp (gamme de dilution de 10^{-1} à 10^{-6} ; Figure 22). La courbe obtenue met en évidence une bonne linéarité mais seulement sur six points de dilution dans un intervalle de $1,95 \times 10^7$ copies (dilution au $1/10^0$) à $1,95 \times 10^2$ copies (dilution à 10^{-6}). Cette dernière dilution correspond à une limite de quantification absolue de 32 bactéries par réaction (195 copies/6 copies par génome). La co-amplification de *β-actine* a permis d'évaluer le nombre moyen de copies de ce gène de truite à $4.157 (\pm 858)$ copies de *β-actine* par réaction au cours de cette analyse. Il est donc possible de déterminer la limite de quantification relative de cette qPCR TaqMan duplex à $4,69 \times 10^{-2}$ copies d'*adnr16S*/*β-actine* (= 195 copies d'*adnr16S*/4.157copies de *β-actine*). Ce résultat souligne la perte de sensibilité de la méthode dans la détection de traces de *F. psychrophilum* dans un échantillon biologique complexe (32 bactéries vs 4 bactéries/réaction). Cette augmentation du seuil de quantification pourrait trouver une explication à travers (i) l'existence d'une possible compétition des gènes *adnr16S* et *β-actine* au cours de leurs amplifications respectives réalisées simultanément lors de la qPCR TaqMan en duplex et/ou (ii) la présence d'inhibiteurs de qPCR dans l'échantillon.

Dans un premier temps, nous avons cherché à infirmer ou confirmer l'implication d'une compétition possible au cours des amplifications des deux gènes dans la dégradation du seuil de détection de *F. psychrophilum*. Pour cela, nous avons réalisé des quantifications de copies d'*adnr16S* porté par pGEM-T_Fp en présence de pGEM-T_Om dans des rapports *adnr16S* vs *β-actine* compris entre 1.000/1 jusqu'à 1/1.000 (Tableau XIV). Les décalages

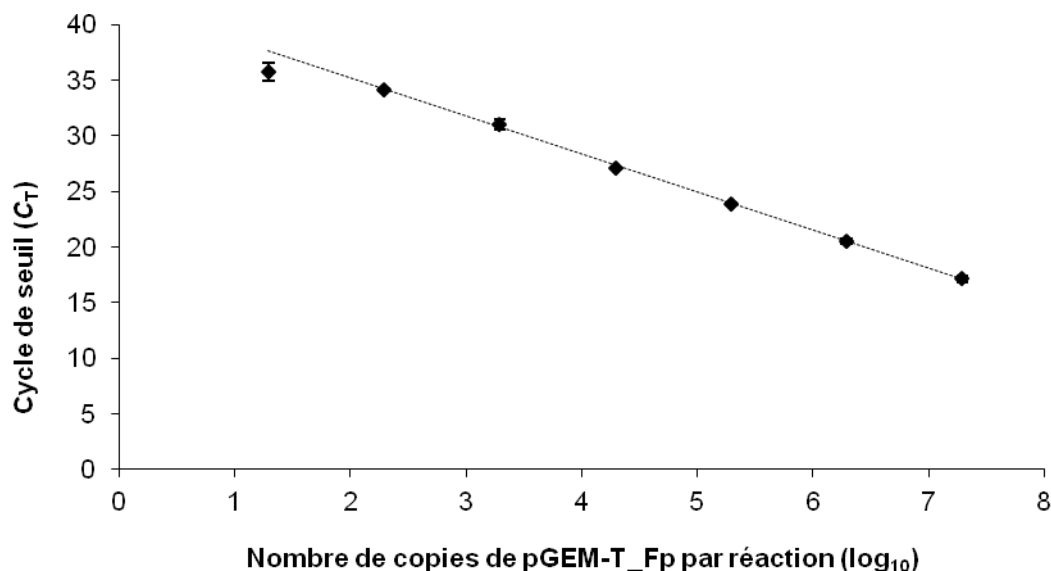


Figure 22. Impact de l'ADN de rate de poisson sur la courbe de calibration qPCR TaqMan en duplex d'*adnr 16S* de *F. psychrophilum*

La sensibilité de la qPCR a été testée pour la détection spécifique de *F. psychrophilum* en présence d'ADN de truite arc-en-ciel indemne d'infection à *F. psychrophilum*. Des dilutions du plasmide pGEM-T_Fp utilisé comme standard sont mélangés avec une quantité constante d'ADN de truite (4.157 ± 858 copies de β -actine par réaction). Les points expérimentaux représentent la moyenne des cycles de seuil (C_T) d'essais réalisés en triplicata (barre d'erreur : \pm écart-types).

Tableau XIV.

Impact du rapport des ADN matrices (*adnr 16S* vs β -actine) sur l'efficacité de la quantification de la charge bactérienne par qPCR TaqMan en duplex *adnr 16S* de *F. psychrophilum* / β -actine de truite.

Rapports préparés	Rapports évalués par la qPCR TaqMan en duplex*	
<i>adnr 16S</i> : β -actine (log ₁₀)	<i>adnr 16S</i> : β -actine (log ₁₀)	Gain/perte du signal Fp (log ₁₀)
1.000:1 (3)	1.335:1 (3,1)	35% (+0,1)
100:1 (2)	59:1 (1,8)	-41% (-0,2)
10:1 (1)	4:1 (0,6)	-62% (-0,4)
1:1 (0)	1:2,1 (-0,3)	-53% (-0,3)
1:10 (-1)	1:27 (-1,4)	-64% (-0,4)
1:100 (-2)	1:387 (-2)	-74% (-0,6)
1:1.000 (-3)	1:1.786 (-3)	-44% (-0,3)

*données obtenues à partir d'analyses réalisées en triplicata

enregistrés entre les rapports préparés des matrices plasmidiques et ceux déterminés par qPCR TaqMan en duplex indiquent que très probablement l'amplification de *β-actine* prend l'avantage sur celle de l'*adnr16S* car systématiquement, le nombre de copies d'*adnr16S* est sous-évalué par rapport à celui des copies *β-actine*, sauf dans le cas du mélange de matrices éminemment favorable à l'*adnr16S* (pGEM-T_Fp/pGEM-T_Om, 1.000/1). L'amplifiat *adnr16S* possède une taille de 292 pb alors que celle de l'amplifiat *β-actine* est beaucoup plus faible (101 pb). Indépendamment de la nature des amorces, cette différence de taille plaide en faveur d'une meilleure rapidité et donc probablement d'une meilleure efficacité dans l'amplification de *β-actine*. Un temps d'élongation anormalement long d'une minute a été choisi pour s'assurer que l'amplifiat d'*adnr 16S* soit intégralement dupliqué. Néanmoins, cette sous estimation du nombre de copies d'*adnr16S* reste tout de même très limitée dans les conditions développées de la qPCR TaqMan en duplex. En effet, l'écart évalué à approximativement $\frac{1}{2} \log_{10}$ entre les nombres de copies présentes et ceux quantifiés par qPCR reste mineur en raison des taux d'infection mesurés sur des échantillons terrains (voir plus bas Figure 23 ; 10^{-4} à 10^{+2} copies d'*adnr16S* /copie de *β-actine*).

Dans un second temps, il s'agissait de s'assurer que la perte de sensibilité dans la quantification de *F. psychrophilum* liée à la compétition des matrices (*F. psychrophilum* vs truite arc-en-ciel) ne compromettait pas la stratégie qPCR TaqMan en duplex choisie. Aussi, nous avons constitué un jeu aléatoire de 25 truites naturellement infectées par *F. psychrophilum* à partir duquel nous avons évalué les infections individuelles de la rate par qPCR TaqMan en duplex ou en simplex (Figure 23). Il faut noter l'absence de forts ratio, les taux d'infection supérieurs à 100 copies d'*adnr16S*/copie de *β-actine* étant rares. En conséquence, le rapport *adnr16S/β-actine* sera dans la grande majorité des cas d'infections naturelles en faveur de la matrice *β-actine* et donc en faveur d'une sous estimation potentielle de l'infection. Néanmoins, la droite de régression ($y = 0,9969 x - 0,0323$; $r = 0,984$) construite à l'aide des 25 points expérimentaux suggère fortement que, même pour les échantillons faiblement contaminés par *F. psychrophilum* (nuage de points encerclés ; Figure 23), la sous estimation potentielle est très faible. En particulier, la courbe observée ne présente pas de plateau sigmoïde qui témoignerait d'une dégradation dans la détermination de faibles taux d'infection par qPCR TaqMan en duplex par rapport à ceux qui pourraient être obtenus par qPCR TaqMan simplex.

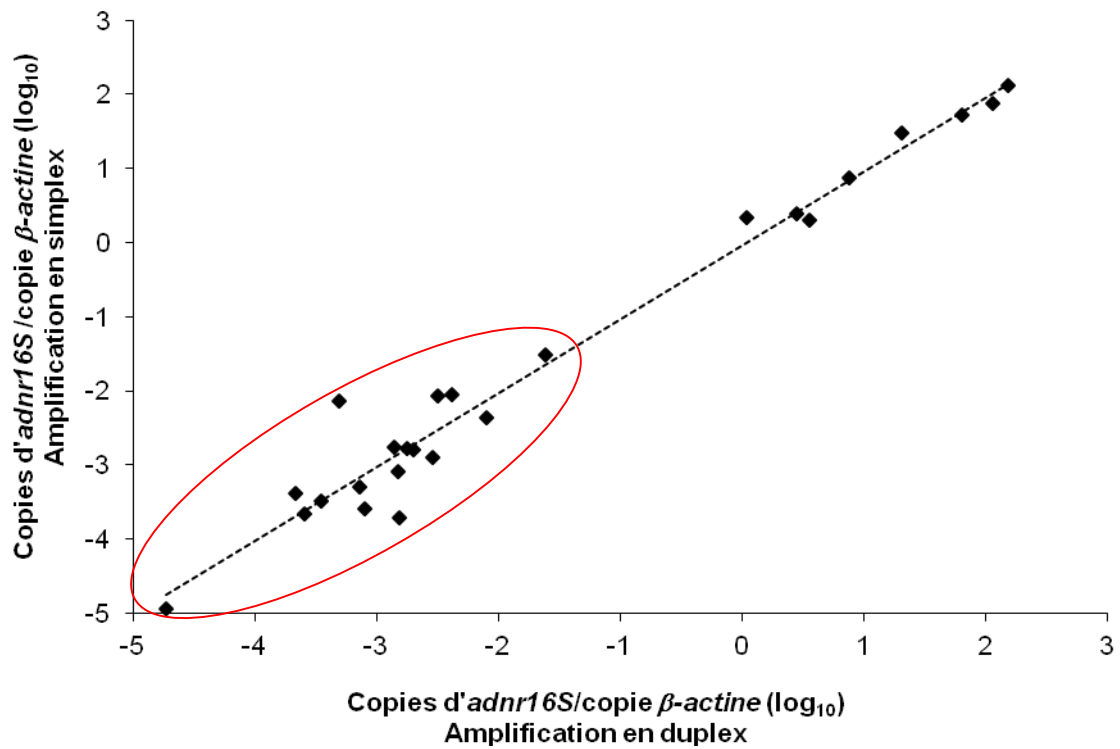


Figure 23. Quantification du nombre de copies d'*adnr 16S* présentes sur des échantillons de truites arc-en-ciel par (i) qPCR TaqMan en duplex *adnr 16S* / *β-actine* ou (ii) par qPCR TaqMan en simplex *adnr 16S*

Les ADNs de rate de 25 truites infectées naturellement ont été extraits et utilisés comme matrices dans les réactions de qPCR. Les essais de qPCR TaqMan en duplex ont été réalisés *en duplicata* en utilisant le mélange d'amorces et de sondes décrit précédemment alors que les essais de qPCR TaqMan en simplex ont été mis en œuvre, *en duplicata* également, en présence des amorces Flapsy_16S_fw / Flapsy_16S_rev et de la sonde Flapsy_16S_probe uniquement. L'abscisse des 25 points expérimentaux représente le nombre de copies d'*adnr 16S* par copie de *β-actine* déterminé par la qPCR TaqMan en duplex ; l'ordonnée correspond au nombre de copies d'*adnr 16S* estimé par la qPCR TaqMan en simplex et ramené au nombre de copies de *β-actine* déterminé au cours de la qPCR TaqMan en duplex. Les échantillons faiblement infectés sont encerclés en rouge.

d. Validation de la qPCR TaqMan sur les isolats terrains de *F. psychrophilum*

Au cours de la campagne de prélèvement d'échantillons terrains (2011-2012), 55 souches bactériennes certifiées *F. psychrophilum* à l'aide des amorces et de la qPCR TaqMan définies par Del Cerro et coll., (2002b) avaient été isolées à partir de cerveau ou de rein de poissons malades ou des eaux de bassins. Le typage génétique par électrophorèse en champs pulsé (= PFGE) des fragments (enzyme *Sal I*) d'ADN a permis de classer ces souches à l'intérieur de cinq groupes (Figure 24).

Les groupes I et II contiennent des souches de *F. psychrophilum* isolées à partir de prélèvements d'eau ou de différents organes de poissons collectés sur différents sites géographiques aquitains. Les souches des autres groupes présentent une spécificité intra-groupe. En effet, les souches du groupe IIIa proviennent de deux sites géographiques (MLE et MTO) et celles du groupe IIIb, d'un site géographique unique (ASO). Le groupe IV se distingue des autres groupes dans la mesure où il ne contient que des isolats d'échantillons d'eau en provenance de sites de production d'esturgeons (FBA et GSE). Il s'agissait de vérifier la réelle appartenance de ces différentes souches à l'espèce *F. psychrophilum*.

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer par qPCR le facteur de spécificité *F. psychrophilum* pour 33 de ces souches à l'aide (i) des amorces et de la sonde Flapsy_16S puis (ii) des amorces 16S_338_fw et 16S_503_rev (Orieux et coll., 2011) en utilisant le standard de quantification pGEM-T_Fp. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau XV. Les scores de facteur de spécificité compris entre 1,3 et 9,2, soit une moyenne de $3,75 \pm 1,78$, témoignent de la réelle appartenance des isolats des groupes II, IIIa et IIIb à l'espèce *F. psychrophilum*. En revanche, les souches bactériennes classées dans les groupes I et IV par l'analyse PFGE obtiennent des facteurs de spécificité dont les valeurs sont inférieures ($0,56 \pm 0,19$) voire très inférieures ($< 2,44 \pm 0,12 \times 10^{-4}$) à 1. Ces résultats remettent en question l'appartenance des isolats des groupes I et IV à l'espèce *F. psychrophilum*. C'est pourquoi, nous avons dans un second temps réalisé un typage de ces isolats douteux par spectrométrie de masse MALDI-TOF complété par une analyse comparative des séquences d'*adnr16S* (Tableau XV). Les résultats MALDI-TOF suggèrent l'appartenance de ces souches au genre *Flavobacterium* mais à des espèces distinctes de *psychrophilum* (*frigidarium*, *psychrolimnae* ou *saccharophilum*) sauf pour la souche ASOK03, qui est probablement du genre *Chryseobacterium*. Cette interprétation est confortée par l'analyse des séquences des gènes qui codent les ARNr16S. En effet les séquences d'*adnr16S* obtenues pour les souches ASOK03, MTOW05 et MLEK14 du groupe I présentent des scores

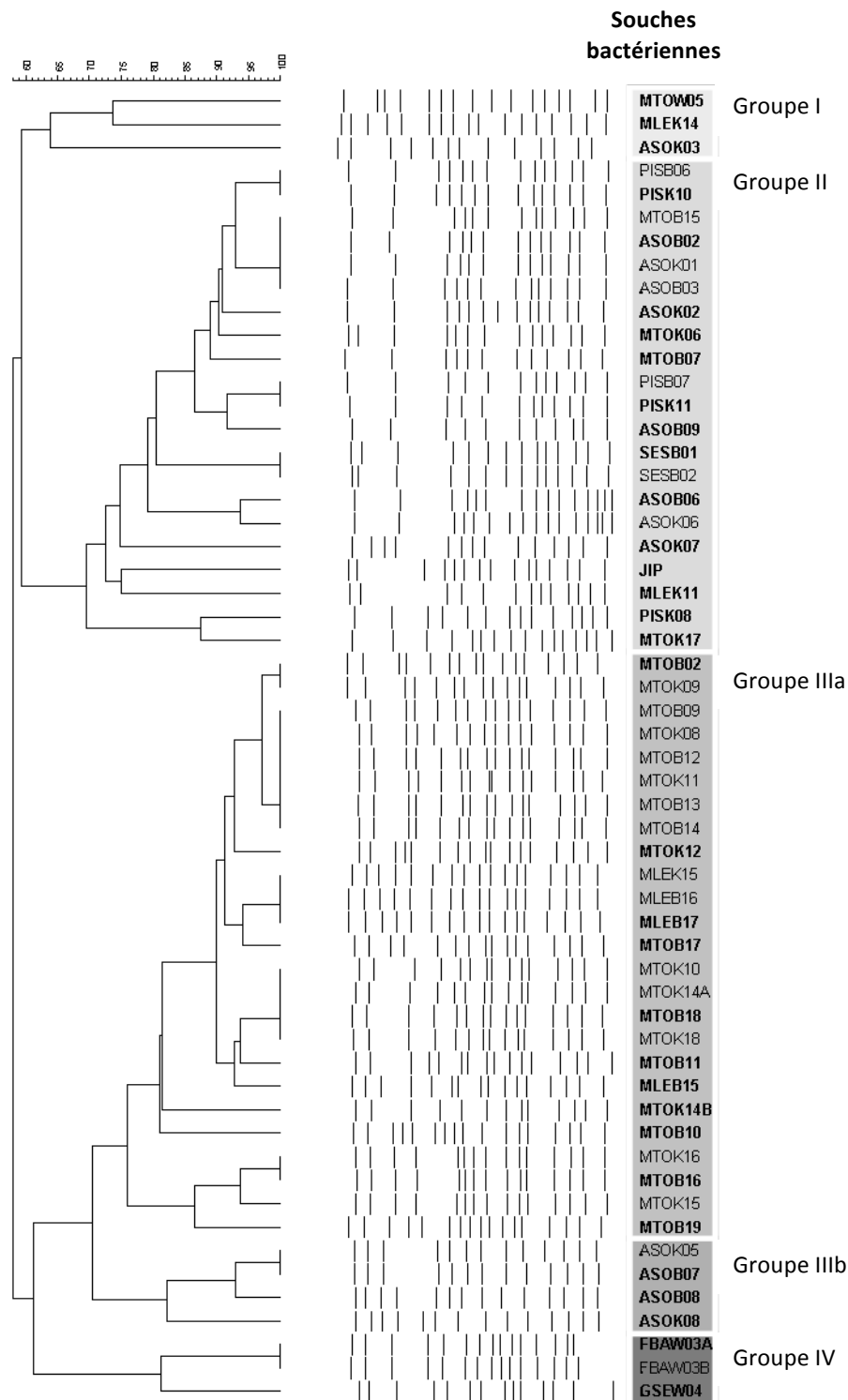


Figure 24. Dendrogramme construit à partir de la mesure de la variabilité génétique évaluée par la méthode PFGE des 55 isolats de *F. psychrophilum* et de la souche type JIP02/86.

La barre horizontale en haut à droite représente le pourcentage de similitude génétique. Les successions de traits verticaux, au centre, représentent la transformation digitalisée du profil d'ADN obtenu par PFGE. Les noms des isolats identifiés par qPCR Del Cerro figurent dans la colonne de droite. Les cinq groupes ont été déterminés grâce à l'analyse PFGE.

BLAST relativement faibles (85 %, 96 % et 94 %, respectivement) lorsqu'elles sont comparées avec celle de *F. psychrophilum*. Ces analyses des séquences révèlent des proximités avec le genre *Chryseobacterium* (98 % pour la souche ASOK03), avec les bactéries de la famille des *Flavobacteriaceae* (99 % pour la souche MTOW05) ou avec l'espèce *F. frigoris* (99 % pour la souche MLEK14). Il en est de même pour les isolats du groupe IV dont les séquences d'*adnr16S* présentent de fortes homologues avec les séquences d'isolats appartenant aux espèces *F. johnsoniae* (99 %), *F. psychrolimnae* (99 %) et *F. saccharophilum* (99 %).

Cette analyse montre que la méthode qPCR TaqMan basée sur les amorces et la sonde Del Cerro classiquement utilisée pour certifier *F. psychrophilum* de nouveaux isolats n'est pas suffisamment fiable car insuffisamment spécifique. En effet, six isolats sur 55, soit $\approx 10\%$ de l'effectif, se sont révélés ne pas appartenir à l'espèce *F. psychrophilum*. En revanche, la méthode qPCR TaqMan développée au cours de ce travail de thèse présente une bien meilleure spécificité puisqu'elle a permis d'identifier les faux positifs. Cependant, cette spécificité n'est pas complète dans la mesure où les amorces et la sonde Flapsy_16S présentent un facteur de spécificité correct pour l'isolat MLEK14 alors que ce dernier appartient probablement à une espèce proche de *F. frigoris* ou *F. frigidarium*. La comparaison entre les séquences des amorces Flapsy_16S et la celle de l'*adnr16S* de la souche MLEK14 ne montre pas d'homologie suffisante pour justifier la valeur de facteur de spécificité relativement haute observée pour une souche de l'espèce *F. frigoris* ou *F. frigidarium*. Comme il est très peu probable que les différentes cultures de la souche MLEK14 réalisées dans des laboratoires différents à partir de stocks congelés différents aient été partiellement contaminées par une souche *F. psychrophilum*, on ne peut pas exclure qu'une ou plusieurs copies du gène d'*adnr16S* de cette souche ai(en)t divergé par rapport aux autres copies.

e. Application de la qPCR TaqMan en duplex pour le suivi d'un épisode de flavobactériose

La pertinence de la qPCR TaqMan en duplex a été éprouvée en tant qu'outil de diagnostique sur une bande de poissons élevés en pisciculture. Les alevins/poissons issus d'un même lot d'œufs ont été répartis en six bassins et ont tous été traités régulièrement avec du peroxyde d'hydrogène et, occasionnellement, de la chloramine T et de l'Agrigerm 2000. Des prélèvements réguliers ont été réalisés dans les bassins parmi les poissons moribonds. La charge bactérienne de *F. psychrophilum* a été mesurée dans la rate à l'aide de la qPCR TaqMan en duplex. En raison d'une très forte crise de mortalité apparue dans tous

Tableau XV
Caractérisation des isolats à l'aide de Flapsy_16S qPCR, du spectromètre de masse MALDI-TOF
et de l'analyse des séquences d'*adnr 16S* par Blast.

Nom de souche	Localisation géographique	Organe	Groupe PFGE	Facteur de spécificité (mean ± SD)	MALDI-TOFF	Analyse BLAST des séquences <i>adnr 16S</i>
ASOK03	ASO	Rein	I	$(2,44 \pm 0,12) \times 10^{-3}$	<i>F. psychrophilum</i>	<i>Chryseobacterium</i> (98 %)
MLEK14	MLE	Rein	I	0,56 ± 0,19	<i>F. frigidarium</i>	<i>F. frigidarium</i> (99 %)
MTOW05	MTO	Eau	I	$(2,63 \pm 0,21) \times 10^{-4}$	<i>F. psychrolimnae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i> (99 %)
ASOB02	ASO	Cerveau	II	5,73 ± 0,11	n.d.	n.d.
ASOB06	ASO	Cerveau	II	2,42 ± 0,24	n.d.	n.d.
ASOB09	ASO	Cerveau	II	6,22 ± 0,18	n.d.	n.d.
ASOK02	ASO	Rein	II	2,82 ± 0,09	n.d.	n.d.
ASOK07	ASO	Rein	II	4,24 ± 0,56	n.d.	n.d.
JIP 02/86			II	1,30 ± 0,52	n.d.	n.d.
MLEK11	MLE	Rein	II	2,63 ± 0,02	n.d.	n.d.
MTOB07	MTO	Cerveau	II	2,48 ± 0,04	n.d.	n.d.
MTOK06	MTO	Rein	II	4,38 ± 0,16	n.d.	n.d.
MTOK17	MTO	Rein	II	1,43 ± 0,04	n.d.	n.d.
PISK08	PIS	Rein	II	1,72 ± 0,08	n.d.	n.d.
PISK10	PIS	Rein	II	6,09 ± 0,05	n.d.	n.d.
PISK11	PIS	Rein	II	1,97 ± 0,12	n.d.	n.d.
SESB01	SES	Cerveau	II	2,21 ± 0,02	n.d.	n.d.
MLEB15	MLE	Cerveau	IIIa	1,73 ± 0,13	n.d.	n.d.
MLEB17	MLE	Cerveau	IIIa	9,22 ± 0,05	n.d.	n.d.
MTOB02	MTO	Cerveau	IIIa	1,95 ± 0,26	n.d.	n.d.
MTOB10	MTO	Cerveau	IIIa	2,30 ± 0,13	n.d.	n.d.
MTOB11	MTO	Cerveau	IIIa	2,08 ± 0,17	n.d.	n.d.
MTOB16	MTO	Cerveau	IIIa	2,82 ± 0,03	n.d.	n.d.
MTOB17	MTO	Cerveau	IIIa	3,53 ± 0,09	n.d.	n.d.
MTOB18	MTO	Cerveau	IIIa	2,65 ± 0,12	n.d.	n.d.
MTOB19	MTO	Cerveau	IIIa	2,23 ± 0,07	n.d.	n.d.
MTOK12	MTO	Rein	IIIa	1,76 ± 0,15	n.d.	n.d.
MTOK14B	MTO	Rein	IIIa	1,72 ± 0,15	n.d.	n.d.
ASOB07	ASO	Cerveau	IIIb	2,29 ± 0,07	n.d.	n.d.
ASOB08	ASO	Cerveau	IIIb	3,16 ± 0,06	n.d.	n.d.
ASOK08	ASO	Rein	IIIb	2,18 ± 0,15	n.d.	n.d.
FBAW03A	FBA	Eau	IV	$(1,17 \pm 0,15) \times 10^{-4}$	<i>F. saccharophilum</i>	<i>F. saccharophilum</i> (99 %)
GSEW04	GSE	Eau	IV	$(4,32 \pm 0,15) \times 10^{-4}$	<i>F. saccharophilum</i>	<i>F. saccharophilum</i> (99 %)

ASO, MTO, MLE, PIS et SES sont les sites d'aquacultures « truite » et FBA et GSE « esturgeon » (Aquitaine, France).

Le facteur de spécificité a été déterminé comme dans les analyses précédentes voir le tableau XII. L'identification des espèces a été réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF et de l'analyse des séquences d'*adnr 16S* (n.d : non déterminé).

les bassins simultanément environ trois mois après l'éclosion, nous avons cherché à tester la sensibilité de la qPCR TaqMan en duplex sur des échantillons de rate de poissons qui avaient été prélevés au cours des 20 – 30 jours qui précédaient la crise (Figure 25).

Durant cette période, on observe une hausse brutale de la mortalité quotidienne avec un pic à 87 jours provoquant une intervention du pisciculteur *via* l'application d'un traitement antibiotique de 7 jours. Il s'ensuit ensuite une baisse sensible de la mortalité avec une rechute 5 jours après l'arrêt du traitement. La charge bactérienne de *F. psychrophilum* a été déterminée au Laboratoire Départemental des Landes grâce au test qPCR TaqMan duplex. Tout d'abord, la charge bactérienne moyenne des échantillons analysés augmente de manière concomitante avec la mortalité quotidienne pour atteindre un maximum à 90 jours, soit 3 jours après le maximum du pic de mortalité (= 87 j). Ensuite, la charge se maintient alors que la mortalité chute pendant le traitement antibiotique réalisé par le pisciculteur. Enfin, la charge en *F. psychrophilum* diminue pendant le rebond de mortalité.

4. Conclusion

La mise au point de méthodes de détection rapides et sensibles de *F. psychrophilum* en tant qu'agent vecteur des infections « BCWD » et « RTFS » est essentielle pour maîtriser dans les élevages les épisodes de flavobactériose. En effet, les traitements curatifs qui peuvent être administrés par l'alimentation sont d'autant plus efficaces qu'ils interviennent tôt dans l'infection, sur des individus insuffisamment affaiblis qui continuent de s'alimenter. De plus, il est nécessaire que les diagnostics d'infection puissent être posés en absence de signes cliniques manifestes. En effet, l'industrie aquacole a mis en place un itinéraire de production qui implique de nombreux sites qui peuvent être géographiquement distants (nursérie, éclosion, ferme de grossissement). Il est donc particulièrement important d'identifier le portage de *F. psychrophilum* par les œufs, les alevins ou les jeunes truitelles afin de limiter au maximum la propagation des infections.

Les méthodes classiques de détermination de la présence bactérienne reposent sur la faculté des cellules à se multiplier et donc à former des colonies visibles sur des milieux solides (boîtes de Petri). Il s'agit de méthodes longues et fastidieuses, qui ne donnent pas une réponse très précise mais qui surtout ne permettent pas la détection de certaines formes bactériennes viables mais non cultivables (VNC). Dans l'environnement, beaucoup de bactéries perdent la faculté de pousser sur les milieux habituellement utilisés (Blackburn et McCarthy, 2000). Dans les conditions standard, le pourcentage de formes viables à partir d'une population de *F. psychrophilum* est estimé à 25 % seulement (Michel et coll. 1999)

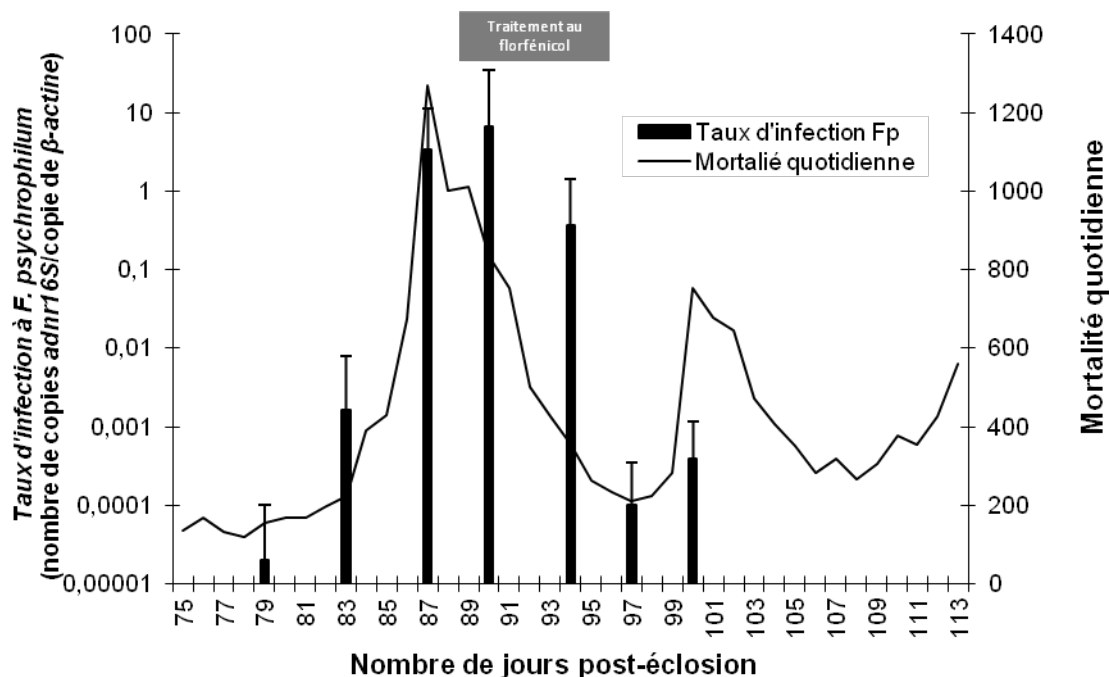


Figure 25. Evolution de la mortalité enregistrée pendant cinq semaines sur un groupe de truites en fonction du taux d'infection par *F. psychrophilum*.

La charge bactérienne en *F. psychrophilum* et la mortalité quotidienne ont été contrôlées pour un même groupe de poissons divisé en six bassins sur un site piscicole. Les barres noires représentent les moyennes et les écarts-types des charges bactériennes mesurées à l'aide de la qPCR duplex *adnr 16S* / β -actine dans les échantillons d'ADN génomique de rate (n = 18, 3 poissons par bassin). La courbe noire représente la mortalité quotidienne cumulée pour chacun des groupes de poissons. La barre horizontale grise représente le traitement antibiotique oral (florfenicol, à une concentration de 8 mL / kg d'aliment pendant sept jours) réalisé par le pisciculteur.

conduisant à une sévère sous-estimation du taux de contamination de l'hôte infecté. C'est pourquoi, un certain nombre d'outils moléculaires ont été développés pour identifier/quantifier *F. psychrophilum* à partir d'échantillons biologiques ; ils ont pour vocation à détecter et/ou amplifier, directement ou indirectement, une séquence ciblée dans le génome de *F. psychrophilum* par PCR classique (Toyama et coll. 1996 ; Urdaci et coll. 1998), par PCR-multiplex (Del Cerro et coll. 2002a ; Onuk et coll., 2010), par PCR-nichée (Madetoja et Wiklund, 2002 ; Baliarda et coll., 2002 ; Izumi et coll., 2005), par test moléculaire d'amplification isothermale (LAMP) (Fujiwara-Nagata et Eguchi, 2009), par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) ou par PCR-quantitative (Orieux et coll., 2011 ; Del Cerro et coll., 2002b) ou (Strepparava et coll., 2012). Les avantages majeurs de la PCR quantitative vs la PCR classique sont (i) une plus grande sensibilité, (ii) une meilleure quantification... malgré un coût largement supérieur. Néanmoins, la plupart de ces approches de quantification absolue donnent des sensibilités de détection exprimées en équivalent génome par réaction ou en équivalent « unité formant colonie » par mg de tissus biologique (UFC/mg) qu'il paraît parfois difficile de comparer d'un échantillon à un autre.

C'est pourquoi au cours de ce travail, nous avons développé un test de détection/quantification de *F. psychrophilum* par qPCR TaqMan en duplex qui permet, au cours d'une même analyse d'un échantillon de truite arc-en-ciel infectée, de déterminer directement un taux d'infection exprimé en copies d'*adn16S* /copie de *β-actine*. Deux jeux d'amorces et sondes spécifiques, nommés Flapsy_16S et Om_actB ont été définis qui ciblent un segment du gène *adn16S* de *F. psychrophilum* ou du gène/*β-actine* de la truite arc-en-ciel, respectivement. La spécificité du premier jeu d'amorces/sonde vis-à-vis de *F. psychrophilum* a été confirmée en calculant un facteur de spécificité selon l'approche développée par Orieux et coll., (2011) ; il est compris entre 0,44 et 5,42 pour les souches *F. psychrophilum* testées alors qu'il est égal à 0 (ou très faible) pour les micro-organismes non-*F. psychrophilum*. De même, les courbes de calibration obtenues mettent en évidence la bonne linéarité du dosage comprise entre $2,4 \times 10^{+7}$ et 24 copies et d'*adn16S*, c'est-à-dire un seuil limite théorique de 4 bactéries par réaction en raison de la présence de 6 copies du gène *adn16S* dans le génome de *F. psychrophilum* (Duchaud et coll., 2007). Ce bon résultat est très proche de la limite de détection de 3 bactéries enregistrée par Marancik et Wiens (2013) dont la qPCR cible dans le génome de *F. psychrophilum* un gène à copie unique qui code une protéine hypothétique de fonction inconnue, mais bien meilleur que celle observée par Strepparava et coll. (2014), 20 bactéries en ciblant *rpoC*, un gène présent dans le génome de la flavobactérie en simple copie.

La spécificité de la qPCR TaqMan a également été éprouvée sur un jeu de 55 isolats de terrain initialement identifiés *F. psychrophilum* par qPCR-DelCerro puis répartis en 5 groupes de variants génétiques construits à partir d'une analyse PFGE (Figure 24). Alors que les isolats des groupes II, IIIa et IIIb sont bien confirmés *F. psychrophilum*, la qPCR TaqMan développée au cours de ce travail donne un signal faible (facteur de spécificité $< 0,6$) ou très faible (facteur de spécificité $\leq 2,6 \times 10^{-3}$) pour les isolats des groupes I et IV. L'analyse MALDI-TOF ou BLAST d'homologie des séquences *adnr16S* de ces isolats confirme leur appartenance à des genres ou espèces distincts de *F. psychrophilum*. Il reste à éprouver la diversité génétique apparente de ces souches révélée par PFGE avec celle observée par MLST pour les souches isolées de salmonidés d'origines géographiques diverses (Siekoula-Nguedia et coll., 2012). Par des approches RAPD, il a été possible (i) d'identifier les isolats de l'espèce *F. psychrophilum* d'autres isolats appartenant au genre *Flavobacterium* mais à des espèces distinctes de *psychrophilum* et qui sont présents dans un même environnement (Crump et coll., 2001) puis (ii) de les associer dans différents génotypes (Valdebenito et Avendano-Herrera, 2009). Cette dernière étude a montré que tous les isolats chiliens présentaient le même profil génétique, sans qu'il soit possible d'établir un lien à l'espèce hôte (truite arc-en-ciel vs saumon d'Atlantique). La méthode REP-PCR et l'étude du polymorphisme d'*adnr 16S* ont montré des résultats similaires sur ces mêmes isolats chiliens qui se sont révélés génétiquement homogènes, alors que la méthode ERIC-PCR n'a pas montré de résultats satisfaisants en raison de problèmes de reproductibilité des analyses (Valdebenito et Avendano-Herrera, 2009).

La méthode MLST a fourni une contribution importante pour évaluer la diversité génétique de *F. psychrophilum* à l'échelle mondiale (Nielsen et coll., 2014). Cette méthode MLST a permis également de mieux comprendre l'origine et la propagation de la flavobactériose au Chili et d'améliorer les pratiques aquacoles pour contrôler la maladie. Un jeu de 94 isolats bactériens collecté à partir des principales zones de production chiliennes a été analysé par MLST. Les données soulignent la large distribution géographique de plusieurs génotypes fortement reliés à ceux des élevages européens et nord-américains (Avendano-Herrera et coll., 2014). Un plus récent travail d'analyses MLST portant sur de nouveaux marqueurs génétiques (8 VNTRs) montre une plus grande diversité des isolats chiliens par rapport à ceux de Norvège suggérant un réservoir de souches de *F. psychrophilum* plus homogène en Norvège. La transmission transgénérationnelle de *F. psychrophilum* dans les divers pays *via* l'exportation des oeufs de saumon au Chili, peut en partie expliquer les différences dans la diversité génétique (Apablaza et coll., 2015).

Notre qPCR TaqMan duplex a ensuite été validée à partir de tissus de truite artificiellement contaminés avec des quantités connues de plasmides pGEM-T_Fp et pGEM-T_Om portant les gènes *adnr16S* ou *β-actine*, respectivement, mais également à partir d'échantillons prélevés sur des truites naturellement infectées. L'augmentation du seuil limite de détection observée (32 vs 4 bactéries) souligne l'action possible d'inhibiteurs de qPCR apportés par l'échantillon de truite, sans exclure une compétition possible des deux gènes lors de l'amplification. Effectivement, une sous-estimation faible mais réelle du nombre de copies d'*adnr16S* est enregistrée lorsque le rapport *adnr16S/β-actine* est inférieur à 100. La détermination du taux d'infection des truites naturellement infectées par qPCR simplex ou par qPCR duplex montre que cette sous-estimation liée à la compétition des deux gènes ciblés au cours de l'amplification est en définitive très faible.

En conclusion, la qPCR TaqMan en duplex décrite ici permet de détecter et de quantifier spécifiquement *F. psychrophilum* dans les tissus de poissons infectés. L'expression des résultats en copies d'*adnr16S*/copie de *β-actine* représente une réelle plus-value par rapport aux approches antérieures dans la mesure où elle permet de s'affranchir de l'étape forcément aléatoire de la pesée des tissus prélevés. Il reste à mieux appréhender le taux d'infection charnière à partir duquel le poisson passe d'un statut porteur-sain à un statut infectieux.

CHAPITRE IV

LA DESINFECTION DES OEUFs DE TRUITE ARC-EN-CIEL EN MILIEU AQUACOLE

Evaluation of glutaraldehyde, chloramine T, bronopol, Incimaxx Aquatic® and Hydrogen Peroxide as biocides against for *Flavobacterium psychrophilum* for sanitization of rainbow trout eyed eggs (2015). Grasteau A, Guiraud T, Daniel P, Calvez S, Chesneau V and Le Hénaff M. Article sous presse dans « Journal of Aquaculture Research and Development ».

Evaluation of Glutaraldehyde, Chloramine-T, Bronopol, Incimaxx Aquatic® and Hydrogen Peroxide as Biocides against *Flavobacterium psychrophilum* for Sanitization of Rainbow Trout Eyed Eggs

Alexandra Grasteau¹, Thomas Guiraud¹, Patrick Daniel², Ségolène Calvez³, Valérie Chesneau⁴ and Michel Le Hénaff^{1*}

¹Bordeaux University, CNRS UMR EPOC, Talence, France

²Laboratoire des Pyrénées et des Landes, Mont de Marsan, France

³LUNAM University, Oniris, UMR INRA BioEpAR, Nantes, France

⁴Groupement de Défense Sanitaire Aquacole d'Aquitaine, Mont de Marsan, France

Abstract

The effective conditions of glutaraldehyde, chloramine-T, bronopol, Incimaxx Aquatic® and hydrogen peroxide as some biocides commonly used by the aquaculture industry were investigated against *F. psychrophilum* in sanitization of rainbow trout eyed eggs. Bacteriostatic tests as well as bactericidal tests using ethidium monoazide bromide PCR assays were conducted *in vitro* on *Flavobacterium psychrophilum* while impacts of chemical treatments were studied *in vivo* on 240 [°C × days] rainbow trout eyed eggs. A 20-min contact time with bronopol (up to 2,000 ppm), chloramine-T (up to 1,200 ppm), glutaraldehyde (up to 1,500 ppm), hydrogen peroxide (up to 1,500 ppm) or with Incimaxx Aquatic® (up to 185 ppm, eq. peracetic acid) was effective against *F. psychrophilum* and did not affect the eyed eggs/fry viability. Collectively, the data obtained here clearly demonstrate that concentrations and duration of treatments commonly used to sanitize eyed eggs are widely overestimated in their effectiveness against *F. psychrophilum*. The new treatment conditions with the five studied biocides are bactericidal for *F. psychrophilum* and safe for rainbow trout eyed eggs. In this work, we developed an experimental approach to test some chemicals against fish pathogens to assist fish farmers in the effective and safe disinfection of eyed eggs.

Keywords: Aquaculture; Ethidium monoazide bromide; Disinfection susceptibility; *Flavobacterium psychrophilum*; Rainbow trout eggs; Viable qPCR

Introduction

Flavobacterium psychrophilum is the aetiological agent of 'rainbow trout fry syndrome' (RTFS) and 'bacterial coldwater disease' (BCWD), the two most significant systemic infections of primarily freshwater-reared salmonid fish [1] such as coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and occasionally other fish species such as ayu (*Plecoglossus altivelis*) [2]. Several clinical manifestations have been described among which the most significant are mortality in juvenile fish (RTFS) and in adult, septicemia preceded by extensive necrotic lesions (BCWD) [3]. Consequently, considerable economic losses to fish aquaculture producers can occur (up to 90% in rainbow trout farmed in Norway [4]) and the erosion of tissue leading to a commercial downgrade of adult fish (for a review of *F. psychrophilum* biology, clinical signs and BCWD prevention and treatment, [5]). The control of *F. psychrophilum* infections is difficult and no effective vaccine is available yet despite numerous studies focused on the capability of some *F. psychrophilum* proteins to induce protection in fish. Potential targets identified for vaccine development include the OmpH-like surface antigen or the outer membrane glycoprotein OmpA [6,7] other immunogenic proteins such as trigger factor, ClpB, elongation factor G, gliding motility protein GldN and a conserved hypothetical protein [8]. Vaccination with FLAVO IPN and FLAVO AVM6, two mineral oil adjuvanted cocktails, induces responses that seemed capable of protecting rainbow trout against infections with *F. psychrophilum* [9]. However, recent study conducted with *F. psychrophilum* gliding motility N (GldN) protein underlines the importance of conducting multiple *in vivo* evaluations on potential vaccine(s) before any conclusions are drawn [10]. To date, the control of infections is yet achieved by antibiotic treatments using medicated feed (mainly florfenicol in 10 mg per kg of fish for 10 days) [11]. Some hatchery managers have expressed concerns about user safety

and the impact on the environment of such molecules. Indeed, these pharmaceuticals or their metabolic residues (i) may be found inside the fish flesh, (ii) may lead to the emergence of resistant strain pathogens and/or (iii) may have side effects on aquatic organisms accidentally exposed to them. Due to environmental constraints, the aquaculture industry seeks to limit the use of antibiotics and emphasizes a preventive approach based on the implementation of effective hygiene measures.

Infections in fish (as for most other livestock) with bacterial pathogens involve either horizontal transmission by direct spread from contaminated animals or from their environment polluted by secretions/excretions of other infected animals, or vertical transmission from the spawners to their offspring through eggs. Such contamination may occur in two ways: the first is true vertical transfer where pathogens from parent broodstock invade the gonads and possibly infect gametes and the future embryos. The second is pseudo-vertical transfer where the surface of the eggs after spawning constitutes a matrix for environmental pathogens and the larvae are contaminated during the hatching of the contaminated eggs. Many molecules have been tested for the surface disinfection of fertilized fish eggs to prevent the pseudo-

***Corresponding author:** Michel Le Hénaff, Bordeaux University, CNRS UMR 5805 'Environnements and Paleoenvironments Oceanic and Continental', Avenue de la Faculté, F-33405 Talence Cedex, France, Tel: +33(0)557 350 738; Fax: +33(0)557 350 739; E-mail: michel.lehenaff@agro-bordeaux.fr

Received July 16, 2015; **Accepted** August 26, 2015; **Published** December 15, 2015

Citation: Grasteau A, Guiraud T, Daniel P, Calvez S, Chesneau V, et al. (2015) Evaluation of Glutaraldehyde, Chloramine-T, Bronopol, Incimaxx Aquatic® and Hydrogen Peroxide as Biocides against *Flavobacterium psychrophilum* for Sanitization of Rainbow Trout Eyed Eggs. J Aquac Res Development 6: 382. doi: [10.4172/2155-9546.1000382](https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000382)

Copyright: © 2015 Grasteau A, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

vertical transfer of pathogens [12]. They reduce the spread of pathogens from parent broodstock farms to hatchery farms and improve the survival to hatch. The list of disinfectants includes glutaraldehyde [13,14], hydrogen peroxide, iodine and tannic acid [15,16], ozone [17] and numerous others. For most of them, CT values have been defined as the concentrations of disinfectants (C; mg/L) multiplied by the exposition time (T; min) for which antibacterial effects have been observed with no significant side effect in hatching ability of the eggs. Thus, it has been shown that concentrations of copper sulfate needed to eliminate *F. psychrophilum* (above 300 mg/L) were toxic for rainbow trout eggs and thus are not recommended for control of RTFS or BCWD [18]. Therefore, the objective of this work was to specifically reassess both bacteriostatic and bactericidal effects of five biocides commonly used by the aquaculture industry against *F. psychrophilum* in sanitization of rainbow trout eyed eggs.

Materials and Methods

Bacterial strains, media and growth conditions

F. psychrophilum strains used in this study were: the reference strain JIP02/86 (INRA) and some freshly isolated strains from rainbow trout showing clinical signs of the disease (Table 1). They were sampled in 2012-2013 from four French rainbow trout farms, where outbreaks of RTFS had been reported. Isolates were collected from organs of trout presenting clinical signs (brain, SESB02, MLEB15 and MTOB07; or kidney, PISK08, and ASOK05) and typed using qPCR [19,20] as well as pulsed-field gel electrophoresis [21]. The bacterial cells were cultivated in a modified FLP liquid medium [0.5% (w/v) tryptone, 0.05% (w/v) yeast extract, 0.02% (w/v) beef extract, 0.02% (w/v) sodium acetate (pH 7.2)] or in FLP solid medium (+ 15 g/L agar). Bacteria were incubated at 14°C under aerobic conditions (orbital stirring, 150 rpm). Purity of the bacterial suspensions was checked (i) by examination of Gram-stained smears and (ii) by qPCR using the universal primer or the *F. psychrophilum* specific set of 16S rDNA primers to calculate a specificity factor as indicated by Orioux et al. [20].

Trout hatchery

Egg samples were taken from a fish farm where recurring outbreaks of RTFS had occurred. The water sources were bore-hole water as well as surface water in a flow through system. Eggs were collected within an egg incubation tray stack 240 [°C × days] once every two days disinfected only with bronopol 50 ppm over a 1-hour period. The eggs were moved in a second farm for disinfection trials.

<i>F. psychrophilum</i> strains		JIP02/86	SESB02	PISK08	MLEB15	MTOB07	ASOK05
Origin		Rainbow trout, Aquitaine (France)	Freshly isolated from rainbow trout, Aquitaine (France)				
MIC (ppm)	Bronopol	3.1	3.1	1.6	3.1	6.3	1.6
	Hydrogen peroxide	7.8	6.2	3.1	31.3	62.5	3.1
	Glutaraldehyde	300.0	160.0	800.0	300.0	300.0	160.0
	Incimaxx Aquatic® (eq. peracetic acid)	125.0	62.5	125.0	62.5	62.5	31.2
	Chloramine-T	313.0	313.0	313.0	313.0	313.0	156.0

Table 1: *F. psychrophilum* strains and related type strains used in this study and the corresponding MIC (minimal inhibitory concentration) observed in the presence of disinfectant.

Preparation of biocide solutions

F. psychrophilum isolates were tested for sensitivity to five biocides commonly used in the fish industry: (i) glutaric dialdehyde or glutaraldehyde (Across Organics, Illkirch, France); (ii) tosylchloramide or *N*-chloro tosylamide, named chloramine-T (Merk Chimie, Fontenay-sous-Bois, France); (iii) 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol, named bronopol (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France); (iv) Incimaxx Aquatic® (i.e., a mix of peroctanoic acid, peracetic acid and hydrogen peroxide, 7 g/L, 83 g/L and 55 g/L, respectively; ECOLAB Food and Beverage Division, Issy-les-Moulineaux, France); and (v) hydrogen peroxide (Merck). They were freshly prepared as stock solutions by dilution in water: (i) glutaraldehyde (50,000 ppm or 0.5 mole/L); (ii) chloramine-T (50,000 ppm or 0.22 mole/L); (iii) bronopol (50,000 ppm or 0.25 mole/L); (iv) Incimaxx Aquatic® (830 ppm or 11 mmole/L in equivalent peracetic acid); and (v) hydrogen peroxide (50,000 ppm or 1.47 mole/L). All tested concentrations of biocides are expressed in ppm.

Antimicrobial assays

Minimal inhibitory concentrations MICs were determined by the broth micro-dilution method in 96-well microtiter plates (Corning's Life Science, Costar N° 3370, Grosseron, France) with *F. psychrophilum* grown to early-exponential phase (optical density at 600 nm [OD₆₀₀] = 0.020). Aliquots of the cell suspension (10 µL; about 50 × 10⁶ bacteria / mL) were cultured in triplicate in 200 µL of two-fold serial dilutions of disinfectant in FLP medium placed in wells of 96-well microtitration plates. Growth and sterility controls were included for each isolate. Microtiter plates were incubated at 14°C and the growth was spectrophotometrically monitored (OD₆₀₀) for four days in a Dynex MRX-II Microplate Reader (Dynex Technologies, France). The MIC was defined as the lowest concentration of disinfectant in which no absorbance change was recorded over a 3-days period. Alternatively, the minimum bactericidal concentration (MBC) was determined to evaluate the cell viability after disinfectant treatments. Culture aliquots (0.5 mL; OD₆₀₀ = 0.05) of *F. psychrophilum* were exposed for 0 to 40 min at room temperature to one of the five disinfectants assayed. Chemical agents were removed by centrifugation (5,000 × g, 10 min, 4°C) and the cells were washed twice in PBS (50 mmol/L sodium phosphate buffer, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4) and dispersed in PBS. Negative control (i.e. 100% of bacterial viability) was 0.5 mL of the working *F. psychrophilum* suspension untreated with any biocide while positive control (i.e. 100% of bacterial mortality) was 0.5 mL of the working *F. psychrophilum* suspension heat-treated at 95°C for 5 min using a standard laboratory heat block. No growth was observed after 5 days at 14°C when 50 µL of this suspension was spread on FLP solid medium. Then, the bacterial suspensions were subjected to EMA (ethidium monoazide bromide or phenanthridium, 3-amino-8-azido-5-ethyl-6-phenyl bromide, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) treatment to evaluate viable/dead cells according to Nocker and Camper [22]. Briefly, EMA dissolved in water (5 mg /mL) was added to *F. psychrophilum* suspensions to a final concentration of 2 µg/mL. A first 10-min incubation step in dark allowed to EMA to interact with DNA from permeabilized cells, only. The photoinduced cross linking EMA-DNA step was obtained by light exposition (2 cycles of 60 sec; 650 Watts halogen lamp) of samples on ice to avoid excessive heating. After EMA-treatment, cells were washed twice and dispersed in water for DNA analysis. The PCR experiment was performed with the *F. psychrophilum*-specific set of primers (Fp_16S1_fw and Fp_16Sint1_rev; [20]) and the amplified DNA was further analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel; the expected size of the amplicons was confirmed by comparison with DNA molecular weight markers (50 bp DNA step ladder, Promega, Charbonnières,

France). The EMA-qPCR reactions were performed *in triplicate* with a MX3000p Stratagene thermocycler (Agilent Technologies, Massy, France) as previously described [20]. Data were expressed as quantities of viable bacterial cells (\pm SD).

Determination of D- and Z-values

For all chemical agents tested in this study, D-value (the decimal reduction time, min) was defined as the exposure time required causing 90% (= one decimal logarithm, i. e., one \log_{10}) reduction of the initial population of *F. psychrophilum* cells, under specified concentrations. Consequently, the initial population of bacterial (about $1-10 \times 10^7$ cells) exposed to the chemical compound at time zero was quantified by EMA-qPCR as well as the survivors at time 10, 20, 30 and 40 min. Residual living cells were expressed as percentage of the initial population. D-values were determined from the negative reciprocal of the slopes of the regression lines using \log_{10} -transformed percentage of survivors *vs* time of exposure to the biocide solution [i. e., $\log_{10} N_s/N_o \times 100 = f(\text{time})$, where N_s is surviving population and N_o is initial population]. Z value was defined as the increase in the concentration of a given biocide necessary to reduce the time of exposure to this biocide by a factor 10 (= one \log_{10} reduction of the time). Practically, Z-value was determined from the negative reciprocal of the slope of the regression line using \log_{10} -transformed D-values *vs* the biocide concentrations [i.e., $\log_{10} D\text{-value} = f([\text{Disinfectant}])$].

Disinfection assays on eyed eggs

Triploid rainbow trout eggs were treated five days before hatching with one of the five disinfectants. Treatments were: (i) bronopol (50, 500 or 2,000 ppm), (ii) hydrogen peroxide (40, 1,000 and 2,500 ppm), (iii) glutaraldehyde (300, 1,500 and 2,000 ppm), (iv) Incimaxx Aquatic® (10, 150 and 185 ppm), and (v) choramine-T (50, 600 and 800 ppm). Untreated eggs were used as controls. Three replicate groups of 200 eggs were disinfected for each treatment in 500 mL beaker (400 mL of disinfectant solution). After a 20-min chemical treatment, eggs were rinsed in fresh hatchery water and placed on shelf (170 \times 90 \times 40 mm) as shown in Figure 1A and 1B, allowing the hatch and 5-7 days later, the fry development over a 5-weeks period (Figure 1C). Eggs and subsequent fry were daily observed after the disinfection step. Water parameters were the followings: (i) temperature: 12°C; (ii) pH 6.5; (iii) hardness below 3°fH. The cumulative percent mortality (CPM) was determined after 20 days, and the relative percent survival (RPS) was calculated using the following equation:

$$RPS = [1 - (\text{CPM of disinfected eggs/fry}) / (\text{CPM of control eggs/fry})] \times 100$$

Values from experiments ($n=3$ per treatment) were expressed as mean \pm SE.

Statistical analysis

GraphPad PRISM® (GraphPad Software, USA) was used to analyze data from disinfection assays on eyed eggs. The significance of cumulative percentage mortality of eyed eggs/fry/juvenile fish was analyzed using a 1-way ANOVA and comparisons of all chemical treatments *vs* control were performed by Bonferroni's Multiple Comparison Test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Effectiveness of disinfectants to prevent the *in vitro* growth of *F. psychrophilum*

Glutaraldehyde, chloramine-T, bronopol, Incimaxx Aquatic® and

hydrogen peroxide were individually assayed to assess the capability of such products to inhibit the growth of five *F. psychrophilum* strains (Table 1). All of them were effective to control *F. psychrophilum* growth; among them, bronopol was the most effective with MICs less than 6.3 ppm. MICs recorded for the four other biocides ranged from 3.1-62.5 ppm for hydrogen peroxide, 160-800 ppm for glutaraldehyde, 31.5-1,000 ppm (eq. peracetic acid) for Incimaxx Aquatic® and 156-313 ppm for chloramine-T, respectively. Very slight differences in sensitivities to disinfectants were recorded with individual *F. psychrophilum* cultures suggesting possible different physiological states of the bacterial starting cells.

Optimization of EMA-qPCR to determine anti-*F. psychrophilum* susceptibility

The viable qPCR was used to quantify the susceptibility of *F. psychrophilum* to disinfectants. The effectiveness of 20 min-hydrogen peroxide exposition time was first tested by classical PCR with the reference strain JIP02/86 and five freshly isolates (Figure 2). The PCR amplification of DNAs using Fp_16S1_fw and Fp_16Sint1_rev primers generated an expected 146 bp-product from all untreated *F. psychrophilum* strains in the absence of EMA. Unlike this, no PCR product was observed from 95°C-heated cells in the presence of EMA indicating that most if not all of the bacterial cells were permeabilized in the course of the heat-treatment. Hydrogen peroxide displayed contrasted efficiencies when tested against the six strains

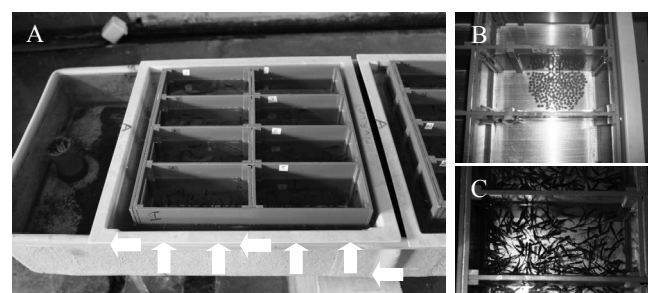


Figure 1: Pictures of the experimental device used to test the impact of different disinfectants on different batches of rainbow trout eggs.

(A) White arrows underline the water circulation inside all batches.
(B) A set of 200 eggs deposited onto shelf just after one biocide treatment.
(C) A set of survival fry 5-weeks post-treatment.

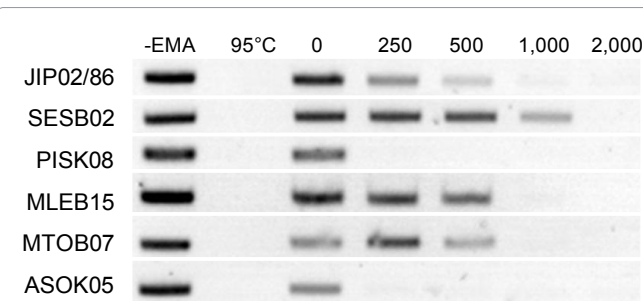


Figure 2: PCR products obtained by PCR using *F. psychrophilum*-specific primer set from EMA treated *F. psychrophilum* cells.

The cells had been previously exposed 20 min to hydrogen peroxide 250, 500, 1,000 or 2,000 ppm (250-2,000, respectively) or not-exposed (0). Positive and negative controls were EMA-untreated cells (-EMA) and 95°C-heated cells (95°C), respectively. *F. psychrophilum* strains were the type-strain JIP02/86 and five other strains freshly isolated from five French farms.

of *F. psychrophilum*. The strains PISK08 and ASOK05 were shown to be highly sensitive to the action of hydrogen peroxide because no amplification occurred for the weakest hydrogen peroxide concentration assayed here (250 ppm). On the other hand, the strain SESB02 exhibited a high resistance to hydrogen peroxide (1,000 ppm) while the three other strains, including the reference strain JIP02/86, were sensitive to concentrations above 500 ppm. Taking into account these results, *F. psychrophilum* JIP02/86 as moderately susceptible strain and reference strain was used to assess *F. psychrophilum* viability by EMA-qPCR after exposure to these biocides.

The next step was to evaluate the potential use of viable qPCR to investigate the hydrogen peroxide capability to kill *F. psychrophilum*. Stress gradients were tested in a preliminary screening over an assay period of 40 min with hydrogen peroxide concentrations ranging from 500 to 2,500 ppm (Figure 3). Increasing stress resulted in an increasing loss in *F. psychrophilum* viability during the first 20-minutes with a maximal three \log_{10} unit reduction in the presence of 2,500 ppm hydrogen peroxide. This observation indicates clearly that not only the membrane integrity of *F. psychrophilum* was compromise by hydrogen peroxide treatment but so the effects observed were stress-dependant (i.e., the tested concentrations and the exposure times). Cell viability recorded after an incubation time above 20 minutes were not included in the exponential portions of the survivor curves for each of the hydrogen peroxide concentrations assayed and consequently not consistent with those observed at 10 and 20 minutes. A possible EMA oxidation with hydrogen peroxide could not be ruled-out; such a chemical alteration may have consequences in the EMA-capability to correctly-interact with DNA and therefore to inhibit further DNA amplifications. Based on this observation, an exposure time of 20 minutes only was selected in subsequent assays with other studied biocides considering that periods of 30 or 40 minutes were too long.

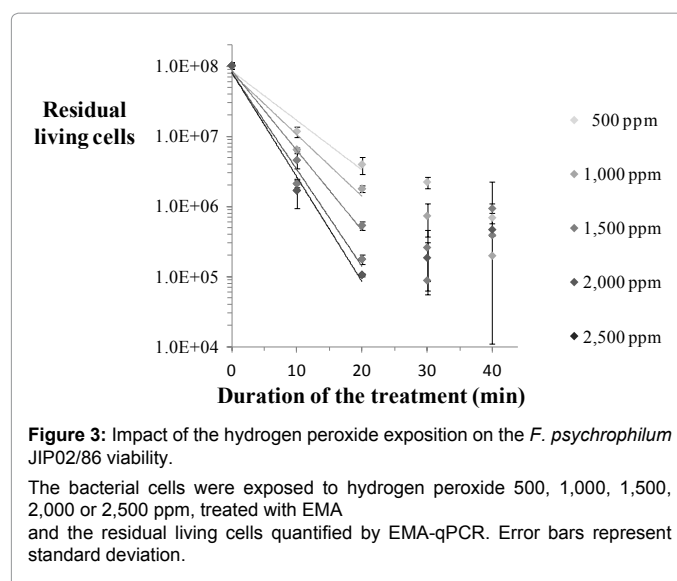
Bactericidal susceptibility of disinfectants against *F. psychrophilum*

The effectiveness of five antibacterial compounds was evaluated by of EMA-qPCR (Table 2). For each of the biocide concentrations tested, D-values were determined in order to calculate the Z-values. Data obtained with bronopol are shown for illustration in Figure 4. A reduction concentration-dependent in the *F. psychrophilum* population was recorded with bronopol treatments; about 0.8 to 3.0 \log_{10} reduction units were observed in the course of 20-min treatments with bronopol 500 ppm to 2,500 ppm, respectively (Figure 4A). D-values derived from slopes of regression lines were found to be included between 25.7 min (bronopol 500 ppm) to 7.2 min only (bronopol 2,500 ppm) (Table 2). Z-value corresponding to bronopol was determined as 3,533 ppm (Figure 4B) indicating that theoretically, one treatment of *F. psychrophilum* with bronopol about 4,000 ppm (i. e., 500 + 3,533 ppm) is required to reduce the exposure time from 25.7 min to 2.6 min with same efficiencies against this pathogen. Alternatively, treatment durations corresponding to 5- \log_{10} reduction in viability were included in a range of about two hours for bronopol 500 ppm to 36 min for bronopol 2,500 ppm. Similarly, D-values and Z-values were calculated for the four other chemical compounds as described above for bronopol (Table 2 and Figure 5). A 14-min exposition to hydrogen peroxide 500 ppm was needed to kill 90% of one suspension of *F. psychrophilum* while it was reduced to about 6 min with hydrogen peroxide 2,500 ppm. The theoretical Z-value was calculated to less than 5,900 ppm and 5- \log_{10} reductions in bacterial viability were observed for treatment expositions between 1 h 30 min to 33 min for hydrogen peroxide 500 ppm and 2,500 ppm, respectively.

The glutaraldehyde treatments assayed (500 to 3,000 ppm) required exposition durations comprised between 1 h to 7 min to kill 90% of a *F. psychrophilum* population while they were between 5 h to less than 40 min to observe a 5- \log_{10} reduction in viability. Z-value was estimated to about 3,000 ppm for glutaraldehyde. Similar efficient exposition times were observed for treatments with the peroctanoic acid, peracetic acid, hydrogen peroxide based product (i.e., Incimaxx Aquatic®) as well as with chloramine-T. However, the Incimaxx Aquatic® concentrations assayed here were 100 to 250 ppm eq. peracetic acid, only. The theoretical Z-value was calculated to about 200 ppm eq. peracetic acid. The efficient concentrations of chloramine-T were between 400 to 1,200 ppm and the Z-value was evaluated to 775 ppm.

Viability of rainbow trout eggs/fry after immersion disinfections

Triplicate groups of 200 rainbow trout eyed eggs were used in the study to evaluate the egg survival to hatch as well as the fry development after one 20-min period of egg chemical treatments (five disinfectants; three concentrations each). Data of viability studies collected at 5 weeks post-disinfection are summarized in Table 3. The viability of eggs/fry was not significantly impacted by disinfection treatments with four over the five chemical products used in this study. Indeed, no excess mortality was recorded when the eggs were treated with bronopol, hydrogen peroxide, Incimaxx Aquatic® as well as chloramine-T at the concentrations tested. Positive RPS values observed in the presence of bronopol and hydrogen peroxide suggest a protective effect of the two biocides relative to the negative control (e.g., untreated eggs) avoiding any multiplication of pathogens on the egg surface. On the other hand, negative RPS values were observed for eggs treated with Incimaxx Aquatic® at all concentrations tested. It could be that Incimaxx Aquatic® has a side effect on the eggs, very low when the disinfectant concentration is low and slightly stronger in the presence of higher concentrations. Similarly, a negative value RPS was obtained with chloramine-T 50 ppm while positive values were recorded for concentrations widely above 50 ppm suggesting the benefit of the disinfection. I could be that a treatment with chloramine-T 50 ppm was not included within the range needed for an efficient immersion disinfection of eggs. Unlike the previous observations, the viability of eggs/fry was clearly impacted by disinfection treatments with glutaraldehyde. Indeed, egg mortality was about 10% in glutaraldehyde 300 ppm, i.e. not different



Chemical product	Concentration (ppm)	Duration of treatment ¹			D-value (min)	t = n × D n = 5-log ₁₀ (h:mm)	Z-value (ppm)
		0 min	10 min	20 min			
Bronopol	500	2.92 ± 0.79 × 10 ⁷	1.99 ± 0.36 × 10 ⁷	4.86 ± 1.45 × 10 ⁶	25.7	2:08	3,571
	1,000		4.39 ± 2.45 × 10 ⁶	1.88 ± 1.12 × 10 ⁶	16.8	1:24	
	1,500		2.23 ± 1.33 × 10 ⁶	4.68 ± 0.43 × 10 ⁵	11.1	0:56	
	2,000		1.28 ± 0.57 × 10 ⁶	1.06 ± 0.81 × 10 ⁵	8.2	0:41	
	2,500		4.32 ± 3.00 × 10 ⁵	4.72 ± 0.84 × 10 ⁴	7.2	0:36	
Hydrogen peroxide	500	10.2 ± 0.90 × 10 ⁷	1.18 ± 0.20 × 10 ⁷	3.97 ± 1.10 × 10 ⁶	14.2	1:11	5,882
	1,000		6.45 ± 0.42 × 10 ⁶	1.78 ± 0.18 × 10 ⁶	11.4	0:57	
	1,500		4.57 ± 1.12 × 10 ⁶	5.36 ± 0.82 × 10 ⁵	8.8	0:44	
	2,000		2.11 ± 0.26 × 10 ⁶	1.77 ± 0.27 × 10 ⁵	7.2	0:36	
	2,500		1.69 ± 0.76 × 10 ⁶	1.06 ± 0.04 × 10 ⁵	6.7	0:33	
Glutaraldehyde	500	3.36 ± 0.89 × 10 ⁷	2.23 ± 1.98 × 10 ⁷	1.57 ± 0.68 × 10 ⁷	60.6	5:03	2,941
	1,000		7.36 ± 1.62 × 10 ⁶	3.32 ± 1.10 × 10 ⁶	19.9	1:40	
	2,000		8.27 ± 3.03 × 10 ⁵	1.71 ± 0.68 × 10 ⁵	8.7	0:44	
	3,000		9.79 ± 4.46 × 10 ⁴	8.25 ± 4.74 × 10 ⁴	7.7	0:38	
Incimaxx Aquatic® (eq. peracetic acid)	100	1.19 ± 0.34 × 10 ⁷	8.29 ± 3.52 × 10 ⁶	4.93 ± 0.43 × 10 ⁶	52.4	4:22	194
	150		7.62 ± 0.78 × 10 ⁶	3.29 ± 1.46 × 10 ⁵	12.8	1:04	
	200		1.66 ± 0.70 × 10 ⁵	5.91 ± 3.94 × 10 ⁴	8.7	0:43	
	250		1.39 ± 1.07 × 10 ⁵	4.48 ± 2.94 × 10 ⁴	8.2	0:41	
Chloramine-T	400	7.91 ± 2.85 × 10 ⁷	4.90 ± 1.22 × 10 ⁷	3.62 ± 0.96 × 10 ⁷	58.8	4:54	775
	600		2.08 ± 0.51 × 10 ⁷	1.08 ± 0.04 × 10 ⁷	23.1	1:56	
	800	8.27 ± 4.81 × 10 ⁷	3.41 ± 0.19 × 10 ⁶	4.39 ± 1.07 × 10 ⁶	15.7	1:18	
	1,000		3.42 ± 0.52 × 10 ⁵	1.83 ± 1.50 × 10 ⁵	7.5	0:38	
	1,200		1.09 ± 1.32 × 10 ⁵	1.38 ± 0.76 × 10 ⁴	5.3	0:26	

¹*Flavobacterium psychrophilum* suspensions were treated with the indicated chemical compound and the viability of the bacterial cells was evaluated by EMA-qPCR as described in the Material and Method section.

Table 2: Impact of chemical treatments on *F. psychrophilum* JIP02/86 viability.

Chemical products	Concentration (ppm)	Viability ¹	
		CPM ² % (mean ± SE)	RPS ³ (%)
Control (PBS)		11.36 ^a ± 2.64	0.00
Bronopol	50	11.10 ^a ± 3.60	2.3
	500	10.50 ^a ± 2.82	7.5
	2,000	8.50 ^a ± 3.56	25.2
Hydrogen peroxide	40	9.60 ^a ± 2.77	15.5
	1,000	8.30 ^a ± 2.14	26.9
	2,500	10.10 ^a ± 3.12	11.1
Glutaraldehyde	300	10.30 ^a ± 4.46	9.3
	1,500	27.30 ^a ± 13.83	-140.4
	2,000	44.50 ^b ± 15.83	-291.8
Incimaxx Aquatic®	10	11.60 ^a ± 5.15	-2.1
	150	12.60 ^a ± 4.98	-10.9
	185	14.30 ^a ± 4.04	-25.9
Chloramine-T	50	14.10 ^a ± 5.85	-24.2
	600	9.40 ^a ± 3.75	17.2
	800	8.50 ^a ± 2.95	25.2

¹Rainbow trout eggs (5 days before hatching) were treated 20 minutes with the corresponding chemical product and viability of eggs/fry was recorded over a 5-weeks period.

²CPM, the cumulative percentage mortality (n=5 per treatment).

³RPS, the relative percentage survival; it was determined relative to PBS treatment. Mean CPM values with different superscripts indicate significant difference at p<0.05.

Table 3: Impact of chemical treatments on rainbow trout eggs/fry viability.

to that observed for untreated eggs, while it was about 30% and 45% in glutaraldehyde 1,500 ppm and 2,000 ppm, respectively. However, the only significant difference was found between the treatment with glutaraldehyde 2,000 ppm and negative control and all almost other chemical treatments assayed in this work.

Discussion

Bronopol has been shown to be effective in protection against parasites infecting rainbow trout such as *Saprolegnia parasitica*, when administered as a daily bath/flush treatment at concentrations of 15 ppm and greater [23] or by *Ichthyophthirius multifiliis*, when exposed as long, low doses (24 h; 1 ppm) as well as short, high doses (30 min;

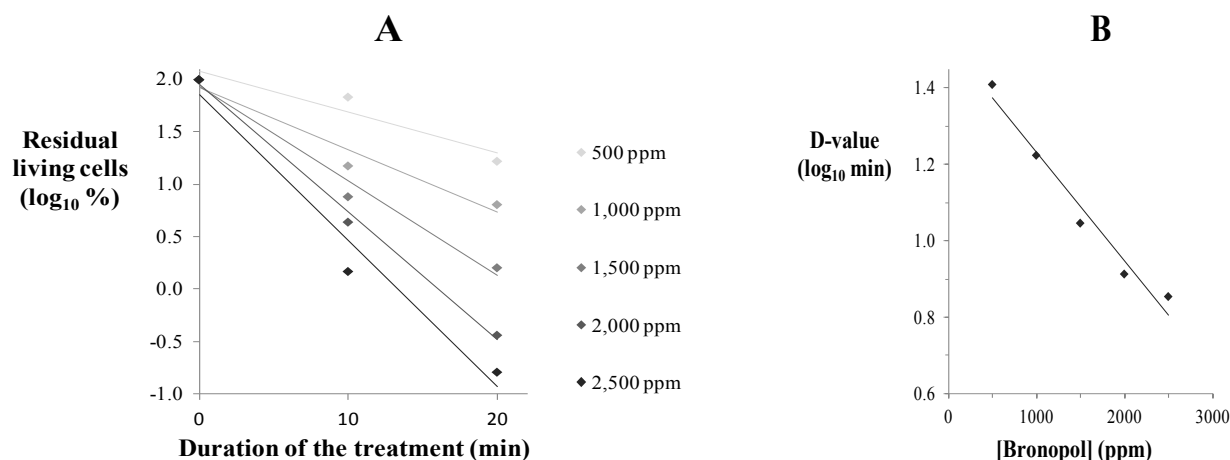


Figure 4: (A) Impact of the bronopol exposition on the *F. psychrophilum* JIP02/86 viability. The bacterial cells were exposed to different concentrations of bronopol, treated with EMA and the residual living cells were evaluated by qPCR. (B) D-values (i.e., the exposition time needed to destroy 90% of the initial cells) were determined for each of the bronopol concentrations assayed and were log₁₀-transformed. A correspondence curve was drawn where each data point represents log₁₀D-value determined for the corresponding bronopol concentration.

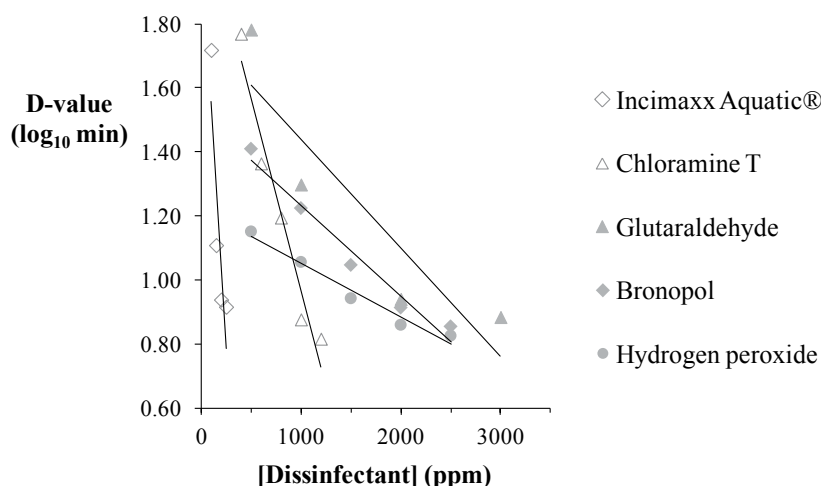


Figure 5: D-values and Z-values were calculated for the four other chemical compounds as described above for bronopol.

100 ppm). Accordingly with Birkbeck et al. [24] who determined MIC of bronopol for 13 bacterial pathogens isolated from marine fish, bronopol MIC ranging from 1.6 to 6.3 ppm were observed for the *F. psychrophilum*. However, none of them were bactericidal because *F. psychrophilum* growth was observed when samples of each mixture were taken two days post-treatment and spread on FLP-agar plate (Data not-shown). Consequently, bactericidal conditions [(i) concentration and (ii) treatment time] for bronopol were determined using the EMA-qPCR approach to identify the effective biocide conditions leading to the permeabilization of *F. psychrophilum* cells. Much higher bronopol concentrations than previously described were needed to observe an impact on the flavobacterial viability. Indeed, one decimal reduction of the viability was observed for treatments ranging from 500 to 2,500 ppm, for 26 to 7 min (D values), respectively. Such high concentrations or bronopol have been already recorded as effective for disinfection. Indeed, a bronopol concentration of 500 ppm was required for surface disinfection of Haddock eggs to achieve a significant reduction in bacterial numbers [25]. Such bronopol doses did not show any side effects on the rainbow trout egg survival: (i) the eggs viability was not

affected by 20 min-long baths in bronopol up to 2,000 ppm; and (ii) the hatching time was not modified significantly compared with controls. Similar observations have been recently made on the insensitivity of crustacean eggs at high bronopol concentrations (until 3,000 ppm administered for 15 min every second day on crayfish eggs) [26].

Chloramine-T is a biocide used worldwide as a disinfectant and antiseptic. Although, it is used in aquaculture against bacterial and protozoal infections eliciting little or no response of oxidative stress biomarkers from *Oncorhynchus mykiss* when exposed to chloramine-T 10 ppm for 20 min (3 days; 3 expositions per day; [27]), it is not yet approved by the U.S Food and Drug Administration (FDA) for use on fish [28]. Previously, chloramine-T 15 ppm was found to be effective within 10 min against some *Aeromonas* spp. bacteria (*A. hydrophila* and *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*) while 60 min of contact time was required to be effective against *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* [29]. In this work, *F. psychrophilum* is much more resistant to chloramine-T since 300 ppm were needed to inhibit the bacterial growth and only severe chloramine-T treatments ranging from 400 to

1,200 ppm (for about 1 hr to 5 min, respectively) were bactericidal. Experiments performed to evaluate chloramine-T as possible candidate for approval for use to control mortality in freshwater-reared salmonids caused by bacterial gill disease have been shown that the fry and fingerlings viability was unaffected by exposure to concentrations less than 100 and 60 ppm, respectively [30]. Clearly, rainbow trout eggs are much more resistant to chloramine-T since none of the 20-min treatments of chloramine-T up to 1,200 ppm did reduce significantly the egg viability.

Hydrogen peroxide as a strong oxidizing agent is widely used by aquaculture industry to treat fungal infections of fish with recommended concentration for bath treatments (500 ppm for 20 min; [31]) as well as to sanitize fish eggs for concentrations ranging from 500 until to 30,000 ppm for few minutes to 60 min [32,33]. While hydrogen peroxide is a useful and environmental friendly biocide, it can promote or boost, in some cases, fish infections (e.g., *Tenacibaculum maritimum* in turbot [34]). This has been smartly used to pre-stress rainbow trout fry with peroxide hydrogen (until 200 ppm; 60 min) to obtain a reproducible immersion model of *F. psychrophilum* infection [35]. Less than hydrogen peroxide 65 ppm was needed to specifically inhibit the growth of the six *F. psychrophilum* strains assayed here, while bactericidal effects on *F. psychrophilum* JIP02/86 were observed from hydrogen peroxide treatments ranging from 50 to 2,500 ppm for less than 15 min to 7 min, respectively. None of these hydrogen peroxide treatments (from 40 to 2,500 ppm; 20 min) on rainbow trout eyed eggs did modify significantly neither the hatching time nor the fry viability or deformity rates. Our data are in agreement with those reported by the Wagner's group. Indeed, short expositions of eyed eggs to hydrogen peroxide 30,000 ppm (1 min) or 6,000 ppm (5 min) reduced well the bacterial load on eggs but did not affect the subsequent development of eggs [15]. Because high hydrogen peroxide concentrations used, attention was focused on the need to maintain hydrogen peroxide solutions to pH values close to neutrality with additions of NaHCO₃. More recently, experiments with different hydrogen peroxide treated groups of trout eggs (from 10,000 ppm for 2 min to 500 ppm for 35 min) confirmed that mortalities did not significantly differ to that in untreated eggs; they pointed-out also that the bacterial abundance on control eggs was higher than treated eggs, with a prevalence of yellow colonies, possibly *F. psychrophilum* [33]. Taken into the whole, these results underline the effectiveness of peroxide against *F. psychrophilum* and its safety in disinfection process of rainbow trout eggs.

Incimaxx Aquatic® has been shown as promising formulation in aquacultural systems since at weaker doses than 8 ppm eq. peracetic acid, it is effective to control the free-living stages of the parasitic protozoae *Ichthyophthirius multifiliis* [36]. Due to the strong bactericidal, virucidal, fungicidal, and sporicidal activities, peracetic acid has been used as an effective therapeutic treatment against some fish pathogens including *Flavobacterium columnare* [37]. Reduction of the *in vitro* growth was observed for *F. columnare* with increasing peracetic acid concentration ranging from 1 to 10 ppm and concentrations higher than 15 ppm have been shown to be toxic for channel catfish eggs [38]. Unlike this, our findings underline the high resistance of *F. psychrophilum* to Incimaxx Aquatic® since no growth inhibition was observed from 31.2-125 ppm (eq. peracetic acid) and reduction of viability was observed for Incimaxx Aquatic® incubations 100-250 ppm for about one hour to 8 min, respectively. No toxicity for rainbow trout eggs was recorded by 20 min-long Incimaxx Aquatic® treatments up to 185 ppm. Due to the acidic character of Incimaxx Aquatic®, it should be stressed that the water hardness has to be monitored and adjusted close to the neutrality to avoid deleterious effect of acidosis [39].

Glutaraldehyde is routinely considered as egg surface disinfectant for aquaculture. Doses of glutaraldehyde between 400–800 ppm for 5-10 min have been shown to improve the hatchability and larval survival in egg batches of Atlantic halibut when used for disinfection of egg surface [40]. However, these authors have cautioned that concentrations and contact times should be evaluated if disinfection with glutaraldehyde is to be applied to other fish species. Here, we found that such doses were bacteriostatic concentrations for *F. psychrophilum* and they were shown bactericidal *in vitro* (i.e., one log₁₀ reduction of bioburden, only) for contact times ranging from 20 to 60 min. Less than 10 min were needed to observe similar effectiveness for glutaraldehyde 2,000-3,000 ppm. However, a 20-min treatment with glutaraldehyde 2,000 ppm did reduce significantly the survival of the rainbow trout eggs. Glutaraldehyde failed to reduce the survival of *F. psychrophilum* at concentrations that were safe for the rainbow trout eggs and some concerns about user safety (i.e. the possible long-term exposure for handlers causing irritations of the eyes, nose, throat, and skin and its potential adverse effects on the aquatic environment, [41]). Therefore there is a need for alternative methods using other chemicals for egg disinfection leading to the elimination of *F. psychrophilum*.

In conclusion, successful aquaculture requires knowledge of toxicity of applied chemicals, and acute toxicity tests are considered essential in selecting appropriate parameters of therapeutic baths. Here, we developed a new toolkit for assistance to fish farmers for the choice of effective chemicals against *F. psychrophilum* used to treat eyed eggs. However, treatments proposed in field condition have been employed in a particular situation of water quality (i.e., pH, temperature, hardness, organic matter.) and consequently they need to be adapted to different water qualities.

Acknowledgements

We would like to thank (i) Vincent Daubigné (Aqualande) and Sébastien Castillon (Aqualande/Viviers de France) for their contribution in management of eggs/fry in hatchery section, (ii) Simon Menanteau-Ledouble, Bastien Ipas and Annie Richard for their technical assistance and (iii) Alain Rives for his contribution for the design/manufacture of the investigational device to test egg/fry viability. This study was financially supported by grants from 'Région Aquitaine/European Regional Development Fund (ERDF)', 'Comité Interprofessionnel des Produits de l'Aquaculture' (CIPA) and by 'Bordeaux Sciences Agro'.

References

1. Borg AF (1960) Studies on myxobacteria associated with diseases in salmonid fishes. American Association for the advancement of science, Wildlife Disease, N° 8, Washington, DC.
2. Iida Y, Mizokami A (1996) Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. Fish Pathol 31: 157-164.
3. Bernardet JF, Bowman JP (2006) The Prokaryotes, an evolving electronic resource for the microbiological community: the genus *Flavobacterium*. (3rd edn), Springer-Verlag, New-York.
4. Nilsen H, Olsen AB, Vaagnes O, Hellberg H, Bottolfsen K, et al. (2011) Systemic *Flavobacterium psychrophilum* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), farmed in fresh and brackish water in Norway. J Fish Dis 34: 403-408.
5. Barnes ME, Brown ML (2011) A review of *Flavobacterium psychrophilum* biology, clinical signs, and bacterial cold water disease prevention and treatment. Open Fish Sci J 4: 40-48.
6. Dumetz F, Duchaud E, LaPatra SE, Le Marrec C, Claverol S, et al. (2006) A protective immune response is generated in rainbow trout by an OmpH-like surface antigen (P18) of *Flavobacterium psychrophilum*. Appl Environ Microbiol 72: 4845-4852.
7. Dumetz F, LaPatra SE, Duchaud E, Claverol S, Le Hénaff M (2007) The *Flavobacterium psychrophilum* OmpA, an outer membrane glycoprotein, induces a humoral response in rainbow trout. J Appl Microbiol 103: 1461-1470.
8. LaFrentz BR, LaPatra SE, Call DR, Wiens GD, Cain KD (2011) Identification of

- immunogenic proteins within distinct molecular mass fractions of *Flavobacterium psychrophilum*. J Fish Dis 34: 823-830.
9. Fredriksen BN, Olsen RH, Furevik A, Souhoka RA, Gauthier D, et al. (2013) Efficacy of a divalent and a multivalent water-in-oil formulated vaccine against a highly virulent strain of *Flavobacterium psychrophilum* after intramuscular challenge of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Vaccine 31: 1994-1998.
 10. Plant KP, LaPatra SE, Call DR, Cain KD (2014) Attempts at validating a recombinant *Flavobacterium psychrophilum* gliding motility protein N as a vaccine candidate in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) against bacterial cold-water disease. FEMS Microbiol Lett 358: 14-20.
 11. Michel C, Kerouault B, Martin C (2003) Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. J Appl Microbiol 95: 1008-1015.
 12. Kumagai A, Nawata A (2010) Prevention of *Flavobacterium psychrophilum* vertical transmission by iodophor treatment of unfertilized eggs in salmonids. Fish Pathol 45: 164-168.
 13. Escaffre AM, Bazin D, Bergot P (2001) Disinfection of *Sparus aurata* eggs with glutaraldehyde. Aquacult Int 9: 451-458.
 14. Katharios P, Agathagelou A, Paraskevopoulos S, Mylonas CC (2007) Comparison of iodine and glutaraldehyde as surface disinfectants for red porgy (*Pagrus pagrus*) and White Sea bream (*Diplodus sargus sargus*) eggs. Aquac Res 38: 527-536.
 15. Wagner EJ, Oplinger RW, Arndt RE, Forest AM, Bartley M (2010) The safety and effectiveness of various hydrogen peroxide and iodine treatment regimens for rainbow trout egg disinfection. N Am J Aquacult 72: 34-42.
 16. Wagner EJ, Oplinger RW, Bartley M (2012) Evaluation of tannic acid for disinfection of rainbow trout eggs. N Am J Aquacult 74: 80-83.
 17. Can E, Karacalar U, Saka S, Firat K (2012) Ozone disinfection of eggs from gillhead seabream *Sparus aurata*, sea bass *Dicentrarchus labrax*, red porgy, and common dentex *Dentex dentex*. J Aquat Anim Health 24: 129-133.
 18. Wagner EJ, Randall W (2013) Toxicity of copper sulfate to *Flavobacterium psychrophilum* and rainbow trout eggs. J Aquat Anim Health 25: 125-130.
 19. Del Cerro A, Mendoza MC, Guizarro JA (2002) Usefulness of a TaqMan-based polymerase chain reaction assay for the detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. J Appl Microbiol 93: 149-156.
 20. Orioux N, Bourdineaud JP, Douet DG, Daniel P, Le Hénaff M (2011) Quantification of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues by qPCR. J Fish Dis 34: 811-821.
 21. Siekoulia Y (2012) Etude de la variabilité génétique de *Flavobacterium psychrophilum*, pathogène de salmonidés. Thèse de doctorat. Université de Nantes.
 22. Nocker A, Camper AK (2006) Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. Appl Environ Microbiol 72: 1997-2004.
 23. Pottinger TG, Day JG (1999) A *Saprolegnia parasitica* challenge system, for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. Dis Aquat Organ 36: 129-141.
 24. Birkbeck TH, Reid HI, Darde B, Grant AN (2005) Activity of bronopol (Pyceze®) against bacteria cultured from eggs of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* and cod, *Gadus morhua*. Aquaculture 254: 125-128.
 25. Treasurer JW, Cochrane E, Grant A (2005) Surface disinfection of cod *Gadus morhua* and haddock *Melanogrammus aeglefinus* eggs with bronopol. Aquaculture 250: 27-35.
 26. Gonzalez A, Celada JD, Melendre PM, Carral JM, Saez-Royuela M, et al. (2013) Effects of different bronopol treatments on final survival rates in the artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae). Aquac Res 44: 354-358.
 27. Tkachenko H, Kurhaluk N, Grudniewska J (2015) Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defences as indicators of different disinfectants exposure in the heart of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquac Res 46: 679-689.
 28. Bowker JD, Carty D, Trushenski JT, Bowman MP, Wandelaar N, et al. (2013) Controlling mortality caused by external columnaris in largemouth bass and bluegill with Chloramine-T or Hydrogen Peroxide. N Am J Aquacult 75: 342-351.
 29. Mainous ME, Kuhn DD, Smith SA (2011) Efficacy of common aquaculture compounds for disinfection of *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, and *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* at various temperatures. N Am J Aquacult 73: 456-461.
 30. Bowker JD, Carty D, Smith CE, Bergen SR (2011) Chloramine-T margin-of-safety estimates for fry, fingerling, and juvenile rainbow trout. N Am J Aquacult 73: 259-269.
 31. Burrige L, Weis JS, Cabello F, Pizarro J, Bostick K (2010) Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. Aquaculture 306: 7-23.
 32. Wagner EJ, Oplinger RW, Bartley M (2012) Effect of single or double exposures to hydrogen peroxide or iodine on salmonid egg survival and bacterial growth. N Am J Aquacult 74: 84-91.
 33. Wagner EJ, Oplinger RW, Bartley M (2012) Laboratory and production scale disinfection of salmonid eggs with hydrogen peroxide. N Am J Aquacult 74: 92-99.
 34. Avendano-Herrera R, Magarinos B, Irgang R, Toranzo AE (2006) Use of hydrogen peroxide against the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* and its effect on infected turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 257: 104-110.
 35. Maria M, Henriksen M, Madsen L, Dalsgaard I (2013) Effect of hydrogen peroxide on immersion challenge of rainbow trout fry with *Flavobacterium psychrophilum*. PLoS ONE 8: e62590. doi:10.1371/journal.pone.0062590.
 36. Picon-Camacho SM, Marcos-Lopez M, Beljea A, Debeaume S, Shinn AP (2012) In vitro assessment of the chemotherapeutic action of a specific hydrogen peroxide, peracetic, acetic, and peroctanoic acid-based formulation against the free-living stages of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora). Parasitol Res 110: 1029-1032.
 37. Marchand PA, Phan TM, Straus DL, Farmer BD, Stuber A, Meinelt T (2012) Reduction of in vitro growth in *Flavobacterium columnare* and *Saprolegnia parasitica* by products containing peracetic acid. Aquac Res 43: 1861-1866.
 38. Straus DL, Meinelt T, Farmer BD, Mitchell AJ (2012) Peracetic acid is effective for controlling fungus on channel catfish eggs. J Fish Dis 35: 505-511.
 39. Marchand PA, Straus DL, Wienke A, Pedersen LF, Meinelt T (2013) Effect of water hardness on peracetic acid toxicity to zebrafish, *Danio rerio*, embryos. Aquacult Int 21: 679-686.
 40. Salvesen I, Oie G, Vadstein O (1997) Surface disinfection of Atlantic halibut and turbot eggs with glutaraldehyde: Evaluation of concentrations and contact times. Aquacult Int 5: 249-258.
 41. Leung HW (2001) Ecotoxicology of glutaraldehyde: review of environmental fate and effects studies. Ecotoxicol Environ Saf 49: 26-39.

Citation: Grasteau A, Guiraud T, Daniel P, Calvez S, Chesneau V, et al. (2015) Evaluation of Glutaraldehyde, Chloramine-T, Bronopol, Incimaxx Aquatic® and Hydrogen Peroxide as Biocides against *Flavobacterium psychrophilum* for Sanitization of Rainbow Trout Eyed Eggs. J Aquac Res Development 6: 382. doi:10.4172/2155-9546.1000382

OMICS International: Publication Benefits & Features

Unique features:

- Increased global visibility of articles through worldwide distribution and indexing
- Showcasing recent research output in a timely and updated manner
- Special issues on the current trends of scientific research

Special features:

- 700 Open Access Journals
- 50,000 Editorial team
- Rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, EBSCO, Index Copernicus, Google Scholar etc.
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.omicsgroup.org/journals/submission>

1. Contexte et rappel de l'objectif

De manière endémique, *F. psychrophilum* est présente dans la plupart des élevages aquacoles de truites, le commerce des œufs participant, entre autres, à la dispersion de l'agent pathogène. Les infections des poissons, comme pour la plupart des autres productions d'animaux de rente impliquent des transferts horizontaux par contacts directs avec des individus ou le proche environnement contaminés, mais également des transferts verticaux des géniteurs vers la descendance *via* les œufs. Cette contamination peut se réaliser de deux manières différentes : (i) la flavobactérie envahit les gonades des parents et alors les gamètes peuvent être porteurs de l'agent pathogène ; on parle d'une contamination verticale « vraie ». (ii) La surface des œufs constitue une matrice très riche sur laquelle de nombreux agents pathogènes peuvent se développer dont *F. psychrophilum* ; au cours de l'éclosion, la larve de poisson peut être contaminée et on parle alors d'infection pseudo-verticale. Une précédente étude (« Flavofimer ») avait souligné que la désinfection des œufs est une étape clé pour limiter la dissémination de l'agent pathogène et donc l'infection pseudo-verticale. De nombreuses molécules ont été testées pour leur capacité à désinfecter la surface des œufs (Kumagai et coll., 2010). Elles permettent de réduire la diffusion de l'agent pathogène et améliorent également la survie des alevins après éclosion. La liste des désinfectants inclut le glutaraldéhyde (Escaffre et coll. 2001 ; Katharios et coll., 2007), le peroxyde d'hydrogène, l'iode ou l'acide tannique (Wagner et coll., 2010 ; 2012) et bien d'autres. Pour la plupart d'entre eux, des valeurs de C_T ont été obtenues en multipliant la concentration du désinfectant (= C ; mg/L) avec le temps d'exposition avec l'agent pathogène (= T ; min) et pour lesquelles des effets bactéricides ou bactériostatiques sont observés avec des impacts négatifs très faibles sur la capacité des œufs à éclore. A titre d'illustration, il a été récemment montré que les concentrations en sulfate de cuivre nécessaires pour éliminer *F. psychrophilum* (≈ 300 mg/L) sont en fait toxiques pour les œufs de truite arc-en-ciel et de ce fait ne sont pas recommandées pour traiter l'infection (Wagner et coll., 2013). D'autres approches pour désinfecter les œufs ont été envisagées avec des résultats contrastés. Ainsi, des traitements des œufs *in vitro* à des températures élevées (55 °C ; 60s) ou des combinaisons d'antibiotiques (ex. pénicilline ou streptomycine) permettent de tuer efficacement *F. psychrophilum*, alors que des traitements avec de l'érythromycine associés à des changements rapides de pH et/ou de pression osmotique se sont révélés totalement inefficaces (Oplinger et coll., 2013).

Les fiches des produits désinfectants préconisent des traitements qui, en limitant la survie de certains agents pathogènes, n'impactent pas le développement des œufs, ni des

alevins. Il existe peu d'indications spécifiques relatives à la désinfection des œufs vis-à-vis de *F. psychrophilum* (ex. Incimaxx, 100 ppm pendant 20 min, Ecolab). Le traitement des œufs à l'aide de composés organiques iodés est largement pratiqué en routine avec des efficacités difficilement quantifiables. Brièvement, le protocole de désinfection comprend généralement une incubation des œufs de 10 minutes dans une solution d'iode actif à 100 mg/L. Des traitements alternatifs de désinfection ont été proposés en incubant les œufs dans un bain de peroxyde d'hydrogène (100 mg/L, 10 min), ou dans une solution de glutaraldéhyde (200 mg/L, 20 min) (Branson, 1996 ; Rangdale et coll., 1997). Le suivi des paramètres d'élevage montrait que la désinfection des œufs œillés au glutaraldéhyde n'impacte pas de manière significative le développement de l'alevin. Des travaux similaires réalisés sur des œufs de daurade royale (*Sparus aurata*) ont montré que les effets toxiques du glutaraldéhyde sur le développement larvaire varient en fonction de la qualité des œufs, de la durée du traitement désinfectant et de la température (Escaffre et coll., 2001). Une exposition des œufs de 4 min à 200 ppm de glutaraldéhyde semble acceptable pour désinfecter des œufs de daurade royale à 18 °C. De bons résultats, en termes de survie, ont également été obtenus après deux traitements successifs à un mois d'intervalle des œufs de loup tacheté (*Anarhichas minor*) avec 150 ppm de glutaraldéhyde pendant 5 minutes. Néanmoins, cette approche conduit à utiliser des substances organiques plus ou moins dangereuses pour le manipulateur et pour l'environnement selon leur utilisation. D'autres molécules sont également utilisables en raison de leur action bactériostatique et/ou bactéricide (iode, peroxyde d'hydrogène, ammonium IV) ; elles peuvent être utilisées seules ou en combinaison (Wagner et coll., 2010) avec des efficacités très variables vis-à-vis des agents pathogènes dont *F. psychrophilum* (Kumagai et coll., 1998 ; Madsen et coll., 2005). En milieu contaminé, l'hygiène rigoureuse des infrastructures limite le risque de transmission de la maladie à des lots indemnes nouvellement introduits. Des procédures de nettoyage/désinfection régulières des équipements sont réalisées dans des bains de formol à 2 % pendant 10 min, de chlore à 1 % pendant 2 minutes ou dans une solution alcaline à pH 13 pendant 2 min (Branson, 1996). Les bonnes pratiques sanitaires à mettre en œuvre dans les piscicultures cherchent : (i) à améliorer le statut sanitaire des élevages, mais également, (ii) à s'assurer de l'innocuité des traitements piscicoles vis-à-vis de l'environnement ; (iii) à préserver le bien-être des poissons ; (iv) à conserver la qualité du poisson commercialisé ; (v) à s'assurer de la sécurité du personnel des élevages, et (vi) également à conserver la rentabilité de l'activité piscicole (Guide des bonnes pratiques sanitaires en élevages piscicoles ; FFA et l'UNPSA, maîtres d'œuvre).

Tableau XVI.
Récapitulatif des effets bactériostatiques (CMI), bactéricides (CMB) vis-à-vis de *F.psychrophilum*
comparés avec la préconisation / usages des biocides étudiés
et leurs impacts sur la viabilité des œufs/alevins de truite arc-en-ciel.

	Guide des Bonnes Pratiques Sanitaires	Usages sur les sites de pisciculture	Etude « Approche intégrée pour la prévention de la flavobactériose des poissons d'élevage »		
	Œufs		CMI	CMB	Viabilité des Œufs
Bronopol	50 ppm 30 min	50 ppm 30 min	1,5-6,2 ppm (moyenne : 3,5 ppm)	500-2500 ppm 20-8 min	RAS (2,000 ppm ; 20 min)
Peroxyde d'hydrogène	100-500 ppm 15-60 min	300-500 ppm 30min	3,5-25 ppm (moyenne : 8,1 ppm)	500-2500 ppm 25-10 min	RAS (2,500 ppm ; 20 min)
Incimaxx	50-100 ppm 20 min (<i>fabricant</i>)		31-1000 ppm (moyenne : 233 ppm)	100-200 ppm 50-8 min	RAS (185 ppm ; 20 min)
Glutaraldéhyde	200-500 ppm 3-10 min	250 ppm 15 min	160-800 ppm (moyenne : 371 ppm)	500-3000 ppm 60-3 min	RAS (<1,500 ppm ; 20 min)
Chloramine T	50 ppm 15 min (<i>fabricant</i>)		156-625 ppm (moyenne : 401 ppm)	400-1200 ppm 40-2 min	RAS (800 ppm ; 20 min)

Aussi, nos objectifs principaux ont été de réaliser un inventaire des biocides autorisés en milieu piscicole, de sélectionner un jeu de cinq désinfectants classiquement utilisés et de revisiter les conditions à préconiser pour l'industrie aquacole pour une meilleure efficacité bactéricide/bactériostatique vis-à-vis de *F. psychrophilum*.

2. Discussion/conclusion

Le bronopol a été utilisé d'abord par l'industrie pharmaceutique et cosmétique, principalement pour prévenir les contaminations microbiennes de ces produits manufacturés. Ce biocide est également intéressant pour lutter contre les parasites qui infectent les poissons d'élevage (ex. *Saprolegnia parasitica* ; *Ichthyophthirius multifiliis*) lorsqu'il est administré sous différentes posologies (60 minutes, 15 ppm ; 30 min; 100 ppm ; Pottinger et coll., 1999). Dans un premier temps, nous avons retrouvé des CMI (= 1,6-6,3 ppm) pour le bronopol vis-à-vis des différentes souches de *F. psychrophilum* cohérentes avec celles qui avaient été trouvées vis-à-vis de 13 agents pathogènes bactériens isolés de poissons marins (Birkbeck et coll., 2005). Cependant, ces CMI se sont révélées non-bactéricides dans la mesure où la croissance de *F. psychrophilum* a été observée à partir d'échantillons prélevés deux jours post-traitement et étalés sur boîtes de Petri. C'est pourquoi, les conditions bactéricides [(i) concentration ; (ii) durée d'exposition] ont été recherchées en utilisant l'approche EMA-qPCR, c'est-à-dire, celles qui conduisent à une perméabilisation de *F. psychrophilum*. Les résultats obtenus montrent que de plus fortes concentrations en bronopol à celles qui inhibent la croissance sont nécessaires pour observer un impact significatif sur la viabilité de la flavobactérie.

Une réduction décimale de la viabilité de *F. psychrophilum* est observée pour des traitements avec du bronopol 500 à 2.500 ppm pour des durées d'exposition de 26 à 7 minutes, respectivement. Ces conditions ne semblent pas avoir d'impact négatif sur les œufs traités : (i) la viabilité des œufs n'est pas affectée après un bain de 20 minutes en présence de bronopol jusqu'à 2.000 ppm ; (ii) la date d'éclosion n'est pas modifiée ; et (iii) les alevins issus des œufs traités ne présentent pas de malformation.

Des résultats analogues sont retrouvés pour les quatre autres biocides testés (Tableau XVI). Dans le cas de la chloramine-T, des expériences réalisées pour évaluer ce biocide dans le traitement d'infections branchiales de poissons salmonidés avaient montré que la viabilité des alevins et des truitelles n'était pas affectée par des expositions à des concentrations en désinfectants inférieures à 100 et 60 ppm, (Bowker et coll., 2011). Clairement, notre travail montre que les œufs de truite arc-en-ciel sont plus résistants à la chloramine-T puisqu'aucun

des traitements de 20 minutes avec le biocide jusqu'à 1.200 ppm ne réduit pas significativement la viabilité des œufs.

Le peroxyde d'hydrogène est largement utilisé par l'industrie aquacole pour lutter contre les parasites de surface (Mitchell et coll., 2009) ou pour traiter les infections fongiques (bains de 20 min ; 500 ppm ; BurrIDGE et coll., 2010). Il s'agit d'un biocide particulièrement intéressant car respectueux de l'environnement. Dans le milieu naturel, il se décompose en eau et en oxygène. Néanmoins, il peut dans certains cas promouvoir, ou amplifier, certaines infections bactériennes chez les poissons d'élevage (ex. *Tenacibaculum maritimum* chez le turbot, Avendano-Herrera et coll., 2006 ; la Columnariose chez le poisson-chat, Thomas-Jinu et coll., 2004 ; la flavobactériose des salmonidés, Henricksen et coll., 2015) en raison de son pouvoir oxydant. Ces effets secondaires sont observés principalement lorsque les temps d'exposition à l'H₂O₂ sont prolongés. Il semble préférable de privilégier des traitements à fortes concentrations administrés sur de « courtes » périodes d'exposition. Ainsi, il a été montré que des bains d'une minute en présence d'H₂O₂ 30.000 ppm ou de cinq minutes à 600 ppm n'affectaient pas le développement ultérieur des œufs œillés (Wagner et coll., 2010). En raison de ces concentrations élevées en peroxyde d'hydrogène, il est nécessaire de maintenir le pH autour de la neutralité par addition de NaHCO₃. Les résultats que nous avons collectés plaident en faveur de traitements plus doux ([H₂O₂] 2.500 à 500 ppm ; 5 à 15 minutes), bactéricides vis-à-vis de *F. psychrophilum* et qui permettent le développement « normal » ultérieur des œufs désinfectés.

L'Incimaxx Aquatic® (un mélange de peroxyde d'hydrogène, d'acides peroctanoïque et peracétique) est un désinfectant très prometteur pour l'aquaculture en raison de son efficacité (ex. anti *Ichthyophthirius multifiliis*, Picon-Camacho et coll., 2012) et de son très faible pouvoir impactant sur l'environnement. Alors que des concentrations en Incimaxx Aquatic® supérieures à 15 ppm (éq. acide peracétique) se sont révélées toxiques sur des œufs de poisson-chat (Straus et coll., 2012), notre travail souligne clairement l'absence de toxicité sur les œufs de truite arc-en-ciel dans les conditions bactéricides proposées (200 à 100 ppm pendant 8 à 50 minutes) pour lutter contre *F. psychrophilum*. En raison du caractère acide marqué de l'Incimaxx Aquatic®, il est nécessaire, comme pour le peroxyde d'hydrogène, de contrôler la dureté de l'eau pour éviter d'éventuels effets délétères de l'acidose (Marchand et coll., 2013).

Au cours de cette étude, le glutaraldéhyde s'est révélé inefficace pour réduire la survie de *F. psychrophilum* aux concentrations non-toxiques pour les œufs de truite arc-en-ciel. Par ailleurs, ce désinfectant pose quelques problèmes ; on ne peut en effet pas exclure des

effets à long-terme pour les personnels manipulateurs (irritations des yeux, du nez, de la gorge et de la peau) ainsi que des effets négatifs potentiels pour l'environnement (Leung, 2001). Très probablement, il va être nécessaire de trouver une alternative au glutaraldéhyde dans le traitement de désinfection des œufs conduisant à l'élimination de *F. psychrophilum*.

En conclusion, nous avons développé au cours de cette étude, une nouvelle " trousse à outils de biocides " en direction des aquaculteurs qui propose des conditions de désinfection réellement bactéricides vis-à-vis de *F. psychrophilum* pour traiter les œufs qui entrent sur les sites piscicoles.

CHAPITRE V

RECHERCHE D'UN TRAITEMENT PROBIOTIQUE

ANTAGONISTE DE *FLAVOBACTERIUM*

PSYCHROPHILUM

1. Contexte et rappel de l'objectif

Les micro-organismes probiotiques les plus utilisés en tant qu'additifs chez l'homme et les animaux de rente terrestres sont les bactéries lactiques. Ces bactéries lactiques (*Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* ou encore *Carnobacterium*) sont capables de croître dans des conditions environnementales variées, et sont ainsi retrouvées dans divers environnements tels que le tractus intestinal de nombreux animaux terrestres et aquatiques, les produits laitiers, les produits de la mer, ou encore certaines plantes (Ringo et Gatesoupe, 1998). Ces micro-organismes ont démontré leur efficacité dans le traitement de diarrhées infectieuses, mais aussi sur l'amélioration de la digestibilité de certains nutriments comme le lactose chez des patients montrant une déficience en lactase (De Vrese et coll., 2001). Chez les animaux terrestres d'élevage comme le porc et le poulet, certaines souches de lactobacilles ont permis d'améliorer des performances zootechniques comme le gain de poids ou encore l'indice de consommation (Bernardeau et coll., 2006). L'amélioration de l'immunité non spécifique par l'ingestion de bactéries lactiques a été largement documentée chez certains animaux. Ainsi, l'effet bénéfique sur le système immunitaire non spécifique a été observé chez la truite fario, *Salmo trutta* nourrie avec une alimentation supplémentée avec un mélange de bactéries lactiques (Balcázar et coll., 2007a et b). Les bactéries lactiques peuvent également agir par antagonisme sur la microflore résidente du tube digestif des poissons en diminuant le pH intestinal *via* la production d'acides gras issus de la fermentation (Rollo et coll., 2006). L'administration de bactéries lactiques permet ainsi de limiter la prolifération d'une flore pathogène. De même, une amélioration significative des poids finaux de juvéniles de bars nourris avec un aliment dopé avec la bactérie lactique *Lactobacillus delbrueckii* a été mise en évidence (Carnevali et coll., 2006). Cette amélioration est liée à l'augmentation du taux de croissance et à une diminution concomitante de la concentration d'un marqueur de l'état de stress, le cortisol. Parallèlement à ces recherches, de nombreuses applications, plus ou moins empiriques, du concept probiotique ont été réalisées, ce qui a notamment permis de diffuser ce concept vers l'aquaculture.

Le Bactocell® est un additif alimentaire composé de la bactérie lactique *Pediococcus acidilactici* MA 18/5M, commercialisé par la société Lallemand. Il a prouvé son efficacité pour améliorer les paramètres zootechniques (taux de la croissance, indice de conversion) chez le poulet et le porc. *P. acidilactici* est à ce jour, le seul probiotique de poisson autorisé dans l'UE (Regulation (EC) 911 /2009). Dans le domaine de l'aquaculture, des essais ont été réalisés sur plusieurs espèces dont l'anguille japonaise, le tilapia rouge et la crevette (Castex

et coll., 2008). Les résultats obtenus indiquent qu'une alimentation supplémentée avec la bactérie lactique *P. acidilactici* MA18/5M permet de diminuer la mortalité des animaux, mais également, chez les truites arc-en-ciel, de prévenir le syndrome de compression de la colonne vertébrale (Aubin et coll., 2005) et d'améliorer les performances zootechniques (les taux de croissance et les indices de conversion) ainsi que les réponses immunitaires humorales (Merrifield et coll., 2011 ; Ramos et coll., 2013, 2015). Récemment il a été montré que l'utilisation de ce probiotique sur le saumon atlantique n'avait pas d'impact négatif sur les performances zootechniques des poissons (Abid et coll., 2013). Les résultats collectés indiquent également que l'effet de pédiocoque induit une protection des muqueuses intestinales par la stimulation du système immunitaire inné. Une amélioration de la croissance du lieu jaune à l'état larvaire est observée lorsque les artémies destinées à leur alimentation reçoivent cette bactérie (Gatesoupe, 2002). L'installation de la flore intestinale chez la truite arc-en-ciel se fait à un stade très précoce et sa composition est impactée par les premières alimentations et par le type de régime alimentaire (Insgerslev et coll., 2013). La consommation d'un cocktail de probiotiques alimentaires (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici* et *Lactobacillus reuteri*) améliore les performances de croissance et le statut sanitaire des poissons (Giennemas et coll., 2014). D'autres combinaisons de probiotiques ont été testées dans l'alimentation de la truite arc-en-ciel. Ces essais ont montré les effets bénéfiques sur l'amplification de certains paramètres du système immunitaire et sur la résistance aux maladies (Hoseinifar et coll., 2015).

L'E112® est commercialisé par le Laboratoire Cobiotech, une filiale du groupe Doxal-France. Il s'agit d'un complexe bactérien fixé sur support inerte constitué de micro-organismes appartenant aux groupes des bactéries lactiques et des *Bacillus subtilis*. Ces micro-organismes ont été sélectionnés notamment pour leurs activités inhibitrices d'autres micro-organismes et pour leurs propriétés enzymatiques. Ces souches ont été isolées à partir de milieux naturels et sont enregistrées dans la collection nationale de l'Institut Pasteur (C.N.C.M. Institut Pasteur-France). Ils ne présentent aucun risque pour l'homme, les animaux et l'environnement. Ils appartiennent tous au groupe I de la classification européenne des micro-organismes (Directive Européenne n°93-88 du 12 octobre 1993 n° 9388 modifiant la Directive 90679 CEE concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail). L'E112® du Laboratoire Cobiotech s'administre par pulvérisation et permet d'obtenir une répartition homogène du complexe bactérien sur toute la surface traitée (ex. l'intérieur d'un bâtiment d'élevage de porcs ou de volailles). Le complexe se stabilise sous la forme de « biofilm positif » qui permet

Tableau XVII.
Composition du cocktail probiotique E112®

		N° IDENTIFICATION COBIOTEX	N° IDENTIFICATION C.N.C.M. – Institut Pasteur
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	ISB 02	I-1433
	<i>amyloliquefaciens</i>	ISB 05	I-1435
	<i>amyloliquefaciens</i>	ISB 06	I-1436
	<i>subtilis</i>	ISB 09	I-1438
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	ISL 01	I-1450
<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i>	ICP 01	I-1654
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	ISLac 01	I-2683

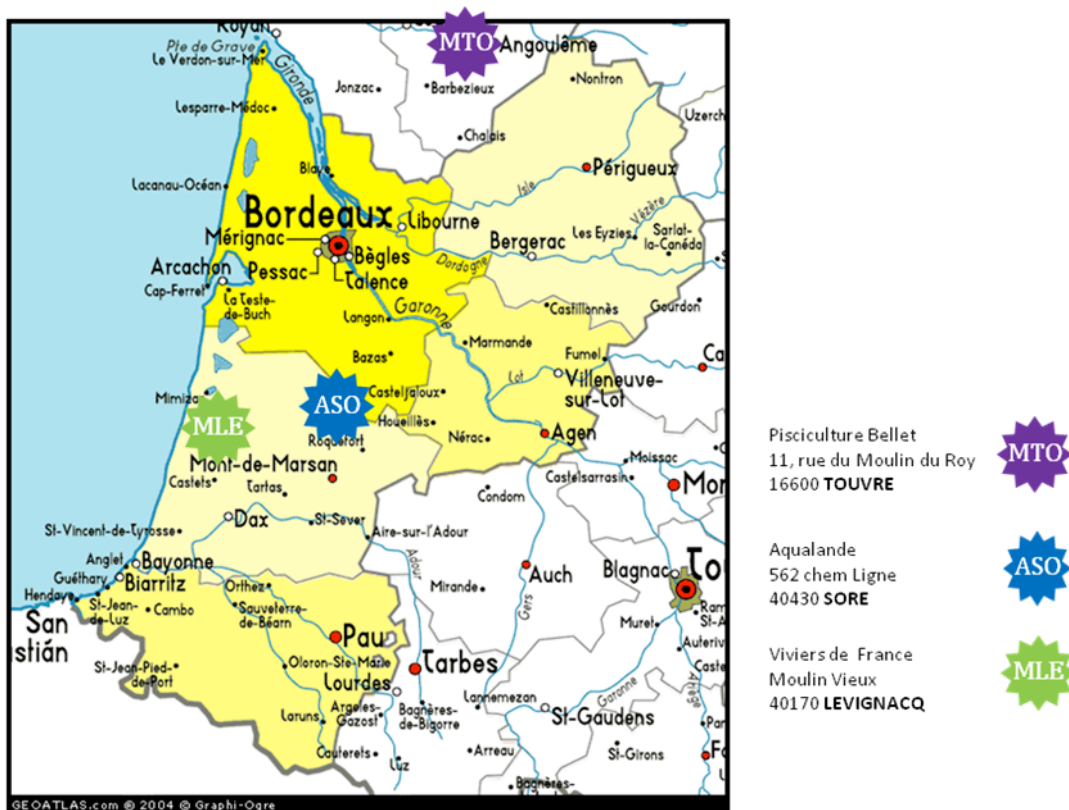


Figure 26. Localisation des sites piscicoles retenus pour les expérimentations avec de l'aliment de poissons supplémenté avec le bactocell® ou E112.

de contrôler l'écosystème de la structure par : (i) une colonisation préventive des surfaces ; (ii) une compétition nutritive et (iii) une production de substances inhibitrices.

De nombreux travaux ont montré que les bactéries lactiques (LAB) sont abondantes dans l'intestin, notamment chez les poissons d'eau douce (Gatesoupe 2008). La plupart des bactéries sont inoffensives, et certaines souches semblent produire des effets bénéfiques sur la santé des poissons, notamment dans la stimulation du système immunitaire des poissons (Akhter et coll., 2015). L'une des principales caractéristiques des probiotiques s'est d'être un antagonisme vis à vis des agents pathogènes. Des bactériocines produites présentent un intérêt non seulement pour l'aquaculture (Araújo et coll., 2015), mais aussi dans la conservation des aliments (Messaoudi et coll., 2013).

Dans le cadre de ce projet, nous avons cherché à objectiver les impacts que peuvent avoir l'E122 ou le Bactocell, sur l'amélioration du statut sanitaire aux stades précoces de la filière truites arc-en-ciel. Il s'agissait en particulier de limiter le nombre et/ou l'intensité des crises de flavobactériose et d'évaluer l'impact de l'administration de ces traitements probiotiques, après avoir préalablement désinfecté les œufs, les auges, les alevins eux-mêmes, sur les paramètres zootechniques et sur les mécanismes de défense des poissons traités.

2. Protocole expérimental

a. Les traitements probiotiques retenus

Parmi les différentes flores commercialisées et qui peuvent être mises en contact avec des animaux de rente (volailles, bovins, crevettes...), seules deux préparations commerciales ont été retenues : Le cocktail E112® (Laboratoire COBIOTEX, Doxal-France, Pessac) et la souche *P. acidilactici* MA 18/5M Bactocell® (Lallemand, Toulouse) (Tableau XVII).

b. Tests d'inhibition de croissance

Les micro-organismes présents dans les cocktails Bactocell® et E112® ont été testés pour leur capacité à inhiber la croissance de *F. psychrophilum* JIP02/86. Brièvement, 100 µL d'une suspension de la flavobactérie ($A_{600} = 0,2$) sont étalés sur une boîte de Petri-FLP. Après 30 minutes de séchage, 10 µL des différentes suspensions de micro-organismes à tester ($A_{600} = 0,1$) sont déposés dans des puits pratiqués dans la gélose de la boîte de Petri-FLP. Les milieux LB et MRS sont utilisés comme témoins négatifs. *F. psychrophilum* forme un tapis

bactérien à la surface de la boîte de Petri après 2 jours d'incubation à 14 °C. Des halos d'inhibition sont observés autour de certains puits chargés avec les micro-organismes testés.

c. Les expérimentations « terrains »

Initialement, 7 sites piscicoles avaient acceptés l'expérimentation dans le cadre de ce projet. En raison de différentes contraintes (disponibilité de l'espace, possibilité d'isoler la zone d'expérimentation et de la zone de production), seuls les sites MTO, ASO et MLE se sont révélés réellement exploitables (Figure 26).

Les expérimentations ont porté sur les éléments suivants : (i) maintien du protocole habituel de désinfection des œufs entrants sur les sites ; (ii) impact d'une étape de désinfection supplémentaire avec le Bronopol, le peroxyde d'hydrogène, l'Incimaxx® ou le Glutaraldéhyde ; (iii) impact de la mise en place d'un traitement probiotique (E112® ou Bactocell®).

d. Préparation et administration des additifs

Les additifs E112® ou Bactocell® utilisés au cours de cette étude ont été préparés sous la forme (i) d'une suspension (10^{11} CFU/L) ou (ii) incorporés dans l'aliment (2,5 g/kg). Brièvement, une quantité de 50 g de l'additif bactérien (= équivalent 2×10^{13} CFU) est incorporée à 20 kg d'aliment en présence d'huile commerciale de type huile de tournesol à l'aide d'une turbine mélangeuse couplée à un moteur électrique.

Les œufs à réception sur les sites piscicoles ont été désinfectés selon le cahier des charges habituel du site puis fractionnés en différents lots. Les lots témoins n'ont subi aucun traitement particulier supplémentaire, sauf ceux prescrits par l'exploitant pour traiter certaines pathologies. Des lots d'œufs « Essais » ont été désinfectés une seconde fois à l'aide de biocides différents de ceux des sites. Enfin, les cocktails microbiens ont été installés sur des lots d'œufs : (i) par balnéation initiale (10^{11} CFU/auge ; ≈ 35.000 œufs), par contacts bihebdomadaires (perfusion d'une dose de 10^{11} CFU administrée sur 1 heure) puis, à partir des premières alimentations, par ingestions d'aliment supplémenté avec l'additif bactérien comme décrit précédemment (10^9 CFU / g d'aliment).

e. Détection du probiotique Bactocell® dans les fèces des poissons

Les fèces des poissons (60 à 80 mg) ont été récupérées après nourrissage par aspiration puis dispersées dans 1 mL de milieu de culture TS. Après dilutions en série

(1/10^e et 1/100^e), 100 µL de chaque suspension sont étalés sur boîte de Petri-MRS. Les colonies sont comptées après une incubation de 48 h des boîtes à 45 °C.

Alternativement, une recherche de *P. acidilactici* (souche MA 18/5M) a été entreprise par PCR en point final. Brièvement, un broyage des fèces a été réalisé pendant 20 sec dans du tampon TENP (Tris pH 8 50 mM, EDTA 20 mM, NaCl 100 mM, Polyvinylpyrrolidone 1 %) et centrifugé (15.000 rpm, 15 min, 4 °C). Une extraction d'ADN bactérien classique est réalisée à partir des surnageants (traitement phénol/chloroforme/alcool isoamylique ; RNase 100 µg/mL, 15 min, 37 °C). Après PCR, précipitation éthanolique de l'ADN, le culot d'ADN bactérien est repris dans 100 µL de tampon TE. La présence d'ADN de Bactocell® dans cette préparation est recherchée par PCR classique à l'aide du couple d'amorces Paci1F-Paci3R que nous avons développé au laboratoire :

- Paci1F (amorce « sens ») : 5' CGCGTAACTACACCAATGATGA 3' ;
- Paci3R (amorce « anti-sens ») : 5' CAACGCTGCCTCGAATAAAT 3' (188 pb).

f. Détection du probiotique E112® dans les intestins de poissons par PCR

Les souches bactériennes du cocktail E112® ont été recherchées dans les intestins de truite par amplification spécifique en point final (PCR classique) de leur ADN. Les poissons testés ont été nourris au laboratoire avec la même quantité de probiotique donnée aux poissons lors des expérimentations terrain.

Le service en ligne Insignia a été utilisé afin de permettre l'identification des « signatures » spécifiques aux bactéries recherchées à partir des données de séquençage. Trois couples d'amorces ont été dessinés :

- *Bacillus (subtilis + amyloliquefaciens)* (ISB02; ISB05; ISB06 et ISB09) :
Bsub3F (amorce « sens ») : 5' GCGATTAAAAAGTATAAACCGACCTCT 3'
Bsub3R (amorce « anti-sens ») : 5' CCACCTGGTGACGTACAGT 3'
- *Lactococcus lactis* (ISLac01) :
Llac1F (amorce « sens ») : 5' TGGCACTTTTACAGGCTACTCA 3'
Llac1R (amorce « anti-sens ») : 5' CTGAGATGCACGCAGTGATT 3'
- *Lactobacillus rhamnosus* (ISL01) :
Lrha1F (amorce « sens ») : 5' GTTTCGCAACTGAACGTTTG 3'
Lrha1R (amorce « anti-sens ») : 5' ACCCTTACCCATAACTGCC 3'

La spécificité de ces couples d'amorces a été contrôlée par PCR classique comme décrit précédemment vis-à-vis des souches ISB02, ISB05, ISB06, ISB09, ISL01, ICP01 et ISLac01 qui

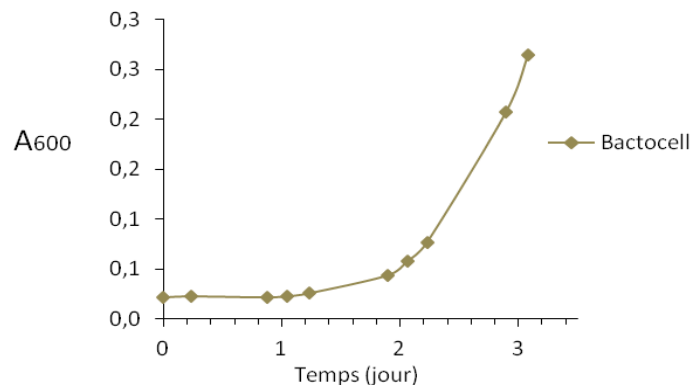


Figure 27. Courbe de croissance de *Pedicoccus acidilactici* (= Bactocell®) à 14°C.

Expérimentation sur le site de Touvre MTO

Mai 2012

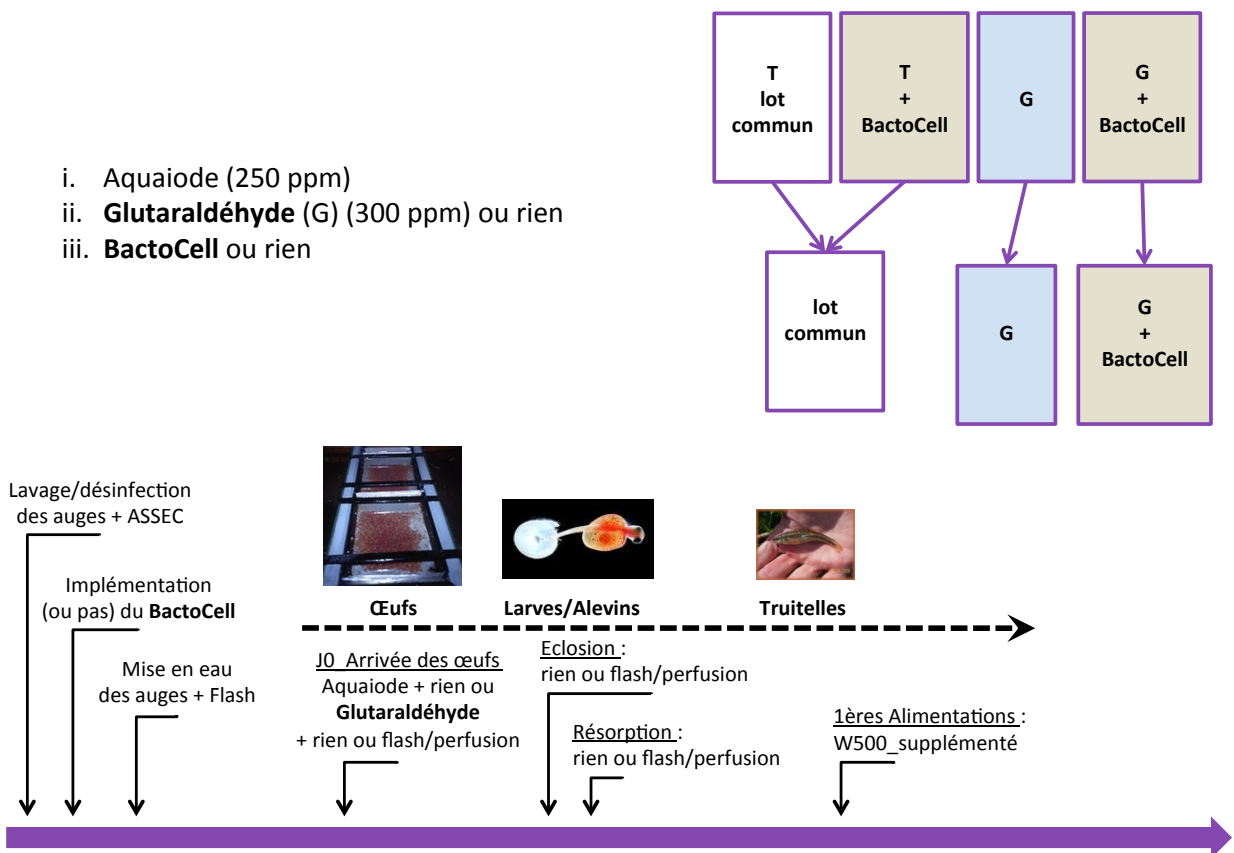


Figure 28. Schéma du plan d'expérience réalisé sur le site de Touvre (Charente) initié en mai 2012.

Les données ont été enregistrées jusqu'en septembre 2012.

constituent le cocktail E112®. Ces couples ont ensuite été utilisés pour rechercher les souches du cocktail E112® dans les intestins des poissons.

3. Résultats et Discussion

a. Croissance du Bactocell® et effet antagoniste vis-à-vis de *F. psychrophilum*

Dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer *in vitro* la capacité de *P. acidilactici* à se multiplier à des températures assez éloignées de la gamme de température optimale de croissance (37-45 °C). Les courbes de croissances réalisées à 14 °C mettent en évidence des temps de latence très longs (une 30^e d'heures) puis des temps de dédoublement évalués à une 10^e d'heures (Figure 27).

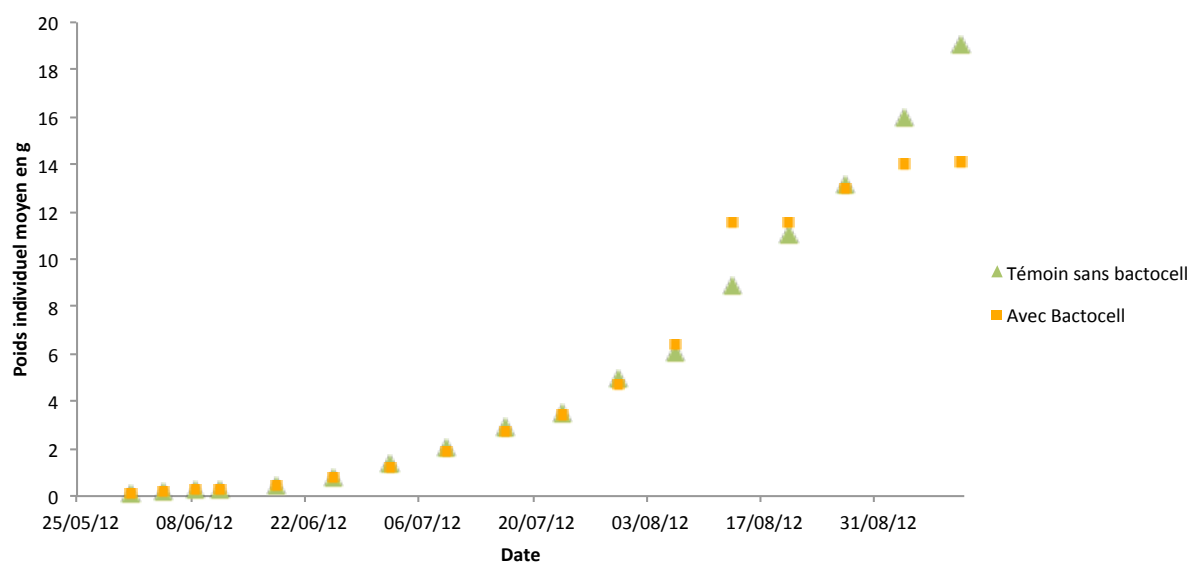
Des tests d'inhibition de croissance ont ensuite été réalisés afin de mettre en évidence une activité potentielle anti-*F. psychrophilum*. Après 48 heures d'incubation à 14 °C, les boîtes de Petriensemencées avec *F. psychrophilum* JIP 02/86 montrent de beaux tapis bactériens. En particulier, des zones de concurrence ne sont pas visualisées autour des puits dans lesquels a été introduite une suspension de *Pediococcus acidilactici*. Cette observation suggère que le pédiocoque ne produit pas de molécules qui empêchent la croissance de la flavobactérie (ex. production d'acides). Cette interprétation est cohérente avec l'observation réalisée par Barreau et coll. (2012) qui ne mettent pas en évidence de gène potentiel qui code une bactériocine.

b. Mise en oeuvre du Bactocell® sur deux sites aquacoles distincts

Une première expérimentation a été réalisée sur le site de Touvre. Les œufs à réception (- 5 jours de l'éclosion) ont été désinfectés à l'Aquaiode (250 ppm) suivi ou pas par une seconde étape de désinfection avec du glutaraldéhyde 300 ppm et enfin traités ou pas avec le Bactocell® selon le plan d'expérience indiqué sur la figure 28.

L'expérimentation s'est limitée à rechercher l'impact de la présence du Bactocell® sur le nombre et l'intensité des épisodes infectieux « naturels ». Les premiers enregistrements ne mettent pas en évidence d'impact de la 2^e étape de désinfection sur l'apparition de crise(s) de flavobactériose. Les conditions de traitement des œufs avec le glutaraldéhyde (300 ppm ; 20 minutes de contact), si elles sont cohérentes avec celles préconisées dans le Guide des Bonnes Pratiques, elles restent très éloignées des conditions réellement bactéricides vis-à-vis de *F. psychrophilum* (1.500 ppm ; 20 minutes) que nous avons pu évaluer dans le chapitre précédent. Globalement, les différents lots d'œufs/alevins ont

a



b

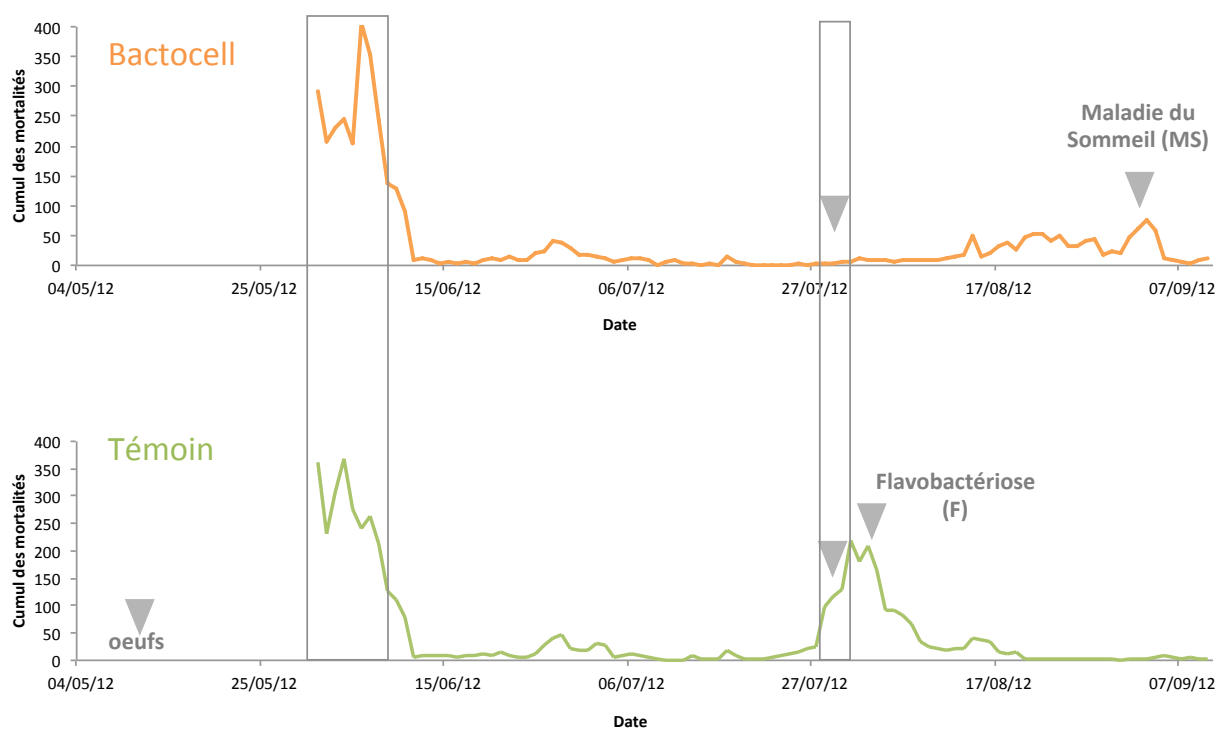


Figure 29. Enregistrement de la prise de poids des alevins (a) et des épisodes infectieux (b) sur les lots de poissons nourris avec de l'aliment supplémenté ou pas avec du Bactocell®.

Les flèches grisées indiquent les échantillons détectés positifs à la qPCR TaqMan duplex *adnr 16S/β-actine*.

largement été épargnés par les épisodes infectieux ; les mortalités enregistrées sont classiquement assez importantes jusqu'à l'éclosion des œufs puis ont été « anormalement » faibles jusqu'au tout début Août. Une première crise de flavobactériose a touché le lot « Témoin » à la première quinzaine d'Août avec des mortalités enregistrées jusqu'à 200 alevins/j. Un traitement d'une semaine à l'aliment médicamenteux (florfénicol) a permis de contrôler l'épisode infectieux. En revanche, une forte mortalité a été constatée fin-Août début Septembre sur le seul lot « Bactocell® », le lot « Témoin » étant épargné. Les premières observations suggéraient une crise de flavobactériose que l'analyse qPCR des échantillons biologiques prélevés n'a pas confirmée. Il s'agissait en fait d'un épisode de la « Maladie du Sommeil » dont l'agent pathogène est un virus qui appartient à la famille des alphavirus. Les animaux atteints présentent un comportement atypique de poissons ; ils restent prostrés au fond des bassins couchés sur le flanc. Il n'existe pas de moyen curatif médicamenteux ; seule, une mise à la diète des poissons se révèle réellement efficace. Dès que les premiers signes de reprise de la natation et de la recherche de nutriments à la surface des bassins apparaissent, les animaux peuvent être à nouveau alimentés.

C'est pourquoi, une baisse significative de la prise de poids des animaux du lot « Bactocell® » a pu être observée début Septembre alors que cette baisse n'est pas présente sur le lot « Témoin » (Figure 29a). La résistance des poissons « Témoins » observée vis-à-vis de la maladie du sommeil pourrait être due (i) à l'existence d'un niveau d'immunité latent supérieur à celui des poissons nourris au « Bactocell® » en raison d'une stimulation liée à la précédente infection à *F. psychrophilum* ou (ii) à une réponse immunitaire plus efficace car moins affaiblie en raison du traitement antibiotique antérieur qui avait permis de contrôler la crise de flavobactériose. En effet, il n'est pas possible d'exclure que les poissons du lot « Bactocell® » réussissent à maintenir *F. psychrophilum* sous contrôle *via* les mécanismes de défense immunitaire et que ceux-ci soient dépassés pour lutter contre le second agent pathogène, lors de l'apparition de la maladie du sommeil. Cette hypothèse est confortée par l'analyse qPCR des échantillons de poissons. Les triangles inversés en gris dans la figure 29b mettent en évidence un portage faible mais réel de *F. psychrophilum* aux différents stades de développement des truites : dans les œufs à l'arrivée sur le site piscicole bien sûr, mais également dans les alevins des lots « témoins » et « Bactocell® » (10^{-5} à 10^{-1} copies d'*adnr16S/β-actine*) (Figure 29b).

Une seconde expérimentation a été mise en place sur le site de Sore (Sore 1, Avril 2012 et Sore 2, Juin 2012) (Figure 30). Les œufs de truite réceptionnés à 5 jours pré-éclosion ont été traités avec du Roméiodé à 0,01 % (p/v) puis traités (ou pas, lot « Témoin ») avec du

Expérimentation sur le site de Sore ASO 1 et 2

Avril et Juin 2012

- i. Roméiodé (0,01 % final)
- ii. **Bronopol (B)** (50 ppm),
Glutaraldéhyde (G) (300 ppm) ou rien
- iii. **Bactocell** ou rien

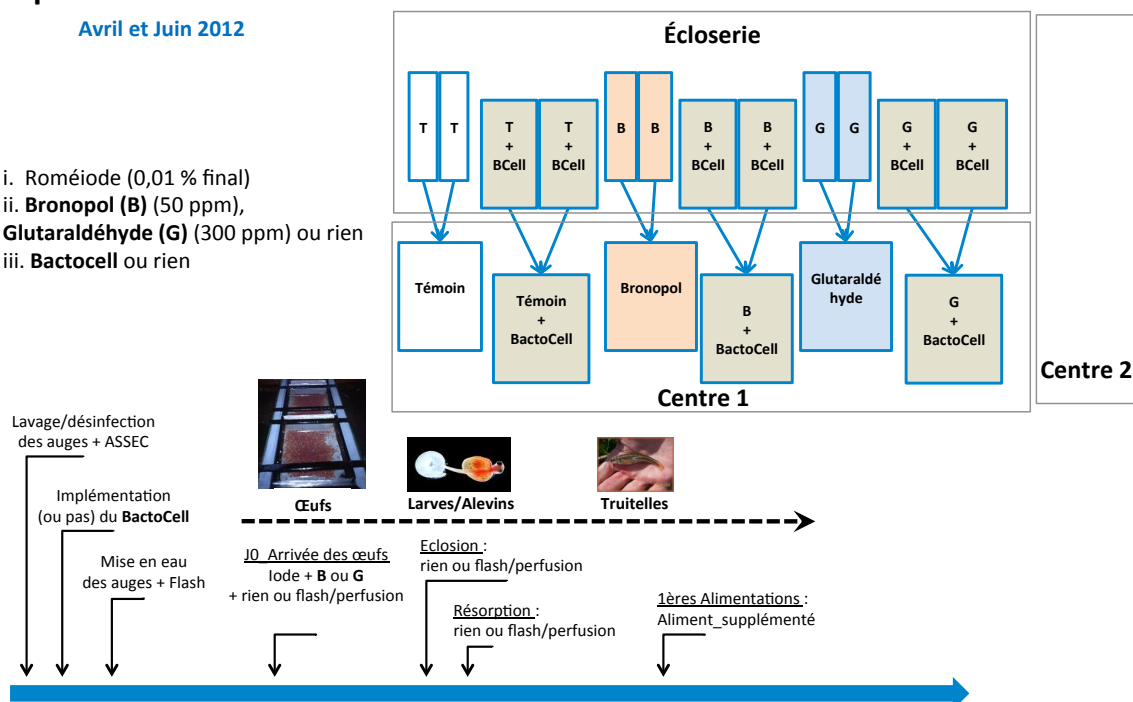


Figure 30. Schéma du plan d'expérience pour le site de SORE (Landes).

Tableau XVIII :

Enregistrement et cumuls des mortalités au cours de l'expérimentation Sore 1 (a) et Sore 2 (b) sur les lots de poissons nourris avec de l'aliment supplémenté (ou pas) avec le bactocell®. (Cumul des mortalités moyennes par bassin ± écart type).

a

Date	Témoin	Bactocell
21/03/13	0 ± 0	0 ± 0
21/04/13	3090 ± 45,1	3097 ± 47,1
21/05/13	1018 ± 13,5	752 ± 8,4
21/06/13	5288 ± 58,8	2993 ± 27,9
21/07/13	3276 ± 28,5	5565 ± 50,4
Mortalité totale	12672 ± 18,216	12407 ± 18,048

b

Date	Témoin	Bactocell
19/06/13	0 ± 0	0 ± 0
19/07/13	7090 ± 20	8428 ± 62,7
19/08/13	3292 ± 24	12506 ± 10,7
Mortalité totale	10382 ± 9,8	20934 ± 25,5

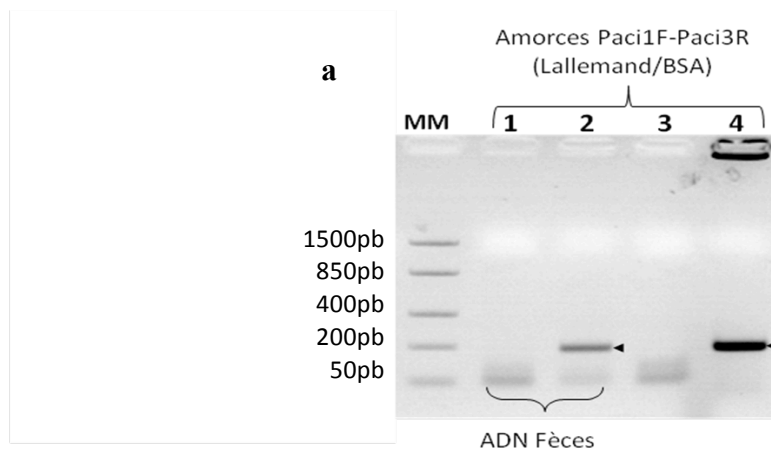
Bronopol 50 ppm ou du glutaraldéhyde 300 ppm. Enfin, certains lots d'œufs ont été mis en contact avec le Bactocell® dans les mêmes conditions que décrites précédemment.

Aucun traitement médicamenteux supplémentaire n'a été nécessaire pour assurer un état sanitaire satisfaisant des poissons aux stades œufs puis alevins. L'alimentation en eau de l'écloserie est assurée à 100 % par une eau de forage. En raison de sa très bonne qualité microbiologique, cette eau ne véhicule pas (ou très peu) d'agents pathogènes du milieu susceptibles d'infecter les auge et donc de coloniser les œufs puis les alevins (Madsen et Dalsgaard, 2008). La situation est radicalement différente à celle retrouvée à l'extérieur de l'écloserie (Centres 1 et 2) où l'eau circulante provient de la sortie d'écloserie mais également d'un cours d'eau. Des traitements à la chloramine-T, au formol ou au peroxyde d'hydrogène doivent alors être appliqués aux truitelles lorsqu'elles sont transférées à l'extérieur de l'écloserie afin de limiter l'incidence de certains agents pathogènes, en particulier certains parasites externes (*Saprolegnia parasitica*).

Comme précédemment, il n'a pas été possible de mettre en avant un impact positif du double traitement de désinfection (Roméiode-Bronopol ou Roméiode-Glutaraldéhyde) des œufs sur l'apparition d'épisode infectieux. Les problèmes sanitaires sérieux apparaissent lors du transfert des truitelles de l'écloserie à l'extérieur, d'abord au Centre 1 puis ensuite au centre 2, très probablement en lien avec (i) la moindre qualité microbiologique des eaux de surface porteuses de flores pathogènes mais également (ii) avec le stress généré au cours de ces transferts. Globalement, la présence de Bactocell® dans l'alimentation limite l'intensité des épisodes infectieux dans la mesure où une mortalité plus importante est enregistrée à partir des lots « Témoin » par rapport aux lots « Bactocell® », à l'exception notable du lot « Bactocell® » de l'expérimentation ASO 2. En effet, une mortalité très importante, jusqu'à 20.934 poissons morts, a été enregistrée à la fin Juillet-début Août sur ce lot alors que le lot « Témoin » ne présentait aucune mortalité significative (Tableau XVIIIa et b).

c. Recherche du probiotique Bactocell® dans les fèces des poissons

Il s'agissait de vérifier que le Bactocell® apporté par l'alimentation soit bien retrouvé dans le tube digestif des poissons élevés au laboratoire. Aussi, nous avons cherché à récupérer les fèces frais des poissons des différents lots (« Témoin » et « Bactocell® ») afin d'y détecter la présence ou l'absence de *P. acidilactici* ou de son ADN. Des colonies du pédiocoque ont été retrouvées sur les boîtes de Petri-MRSensemencées avec des échantillons de fèces de poisson du lot « Bactocell® » alors qu'aucune colonie n'a pu être mise en évidence à partir des échantillons de fèces de poisson du lot « Témoin ». Ce résultat



b

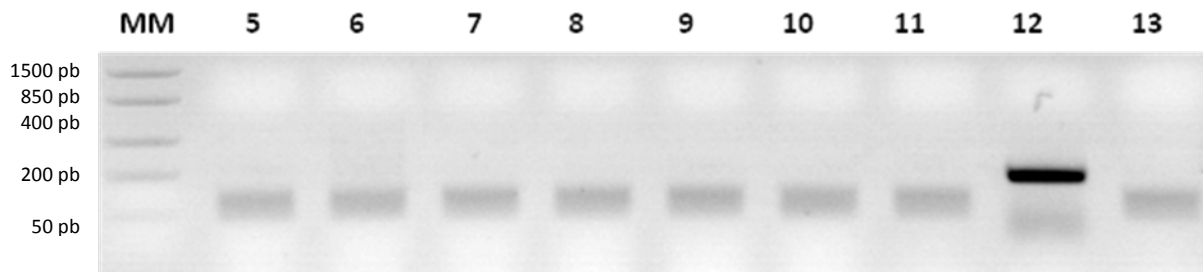


Figure 31. Analyse en gel d'agarose des produits d'amplification obtenus à l'aide des amorces Paci1F/Paci3R à partir des échantillons suivant.

ADN extrait de fèces poisson Témoin (1), ou poisson Bactocell (2), témoin négatif (eau) (3) et ADN génomique de Bactocell (4) (Figure 32a). ADN extrait de divers souches : *B. subtilis* ISB02 (5) ; *B. amyloquefaciens* ISB05 (6) ; *B. amyloquefaciens* ISB06 (7) ; *B. subtilis* ISB09 (8) ; *L. rhamnosus* ISL01 (9) ; *L. Lactis* ISLac01 (10) ; *P. acidilactici* ICP01 (11) ; Bactocell (12) et témoin négatif (eau) (13) (Figure 32b).

souligne la réelle ingestion et le transit du pédiocoque dans le tube digestif des poissons « Bactocell® ».

De la même façon, de l'ADN de *P. acidilactici* a été mis en évidence après amplification par PCR classique dans les fèces de poissons alimentés avec le « Bactocell® ». Le couple d'amorces Paci1F et Paci3R que nous proposons permet l'amplification d'un produit de taille attendu (Figure 31a). La spécificité des amorces du pédiocoque a été démontrée sur un petit panel de souches probiotiques (Figure 31b).

d. Croissance du cocktail E112® et effet antagoniste vis-à-vis de *F. psychrophilum*

Les souches bactériennes du cocktail E112® ont été mises en culture individuellement à 14 °C afin de suivre leur croissance à cette température. Les résultats obtenus qui sont consignés dans la figure 32 et le tableau XIX soulignent la croissance relativement rapide à cette température des souches de *Bacillus amyloliquefaciens* (ISB05 et ISB06), de *P. acidilactici* (ICP01) et, dans une moindre mesure, de *Bacillus subtilis* (ISB02 et ISB09). En revanche, les souches de *Lactococcus lactis* (ISLac01) et *Lactobacillus rhamnosus* (ISL01) présentent des temps de génération très faibles à cette température. Des tests d'inhibition de croissance ont été réalisés en utilisant *Listeria innocua* comme bactérie indicatrice ; il s'agit d'une souche bactérienne connue pour son innocuité mais également pour sa grande sensibilité aux molécules à activité anti-microbienne. Les données collectées mettent en évidence l'action antagoniste des souches du cocktail E112® vis-à-vis de *F. psychrophilum* JIP02/86 à l'exception des souches ISB02 et ISB09 de *Bacillus subtilis* (Tableau XX). Les souches de *B. amyloquefaciens* et *P. acidilactici* du cocktail E112® pourraient bien être les plus intéressantes en raison de leur capacité (i) à se multiplier à des températures proches de celles rencontrées sur les sites piscicoles et (ii) à présenter un effet antagoniste vis-à-vis de la flavobactérie. On ne peut toutefois pas exclure que la seule présence des autres souches bactériennes, dès lors qu'elles sont apportées en quantités suffisantes, ait des impacts positifs significatifs pour combattre la présence de *F. psychrophilum*.

e. Les expérimentations terrains avec le cocktail de probiotique E112®

Deux expérimentations ont été mises en place successivement sur le site de Lévignacq. Les œufs à réception (-5 jours de l'éclosion) subissent une première étape de désinfection avec du glutaraldéhyde 250 ppm suivie (ou pas) d'une seconde étape avec du peroxyde d'hydrogène à 500 ppm ou de l'Incimaxx (100 ppm d'équivalent acide peracétique) puis enfin, mis en contact (ou pas) avec le cocktail E112® comme indiqué dans la figure 33.

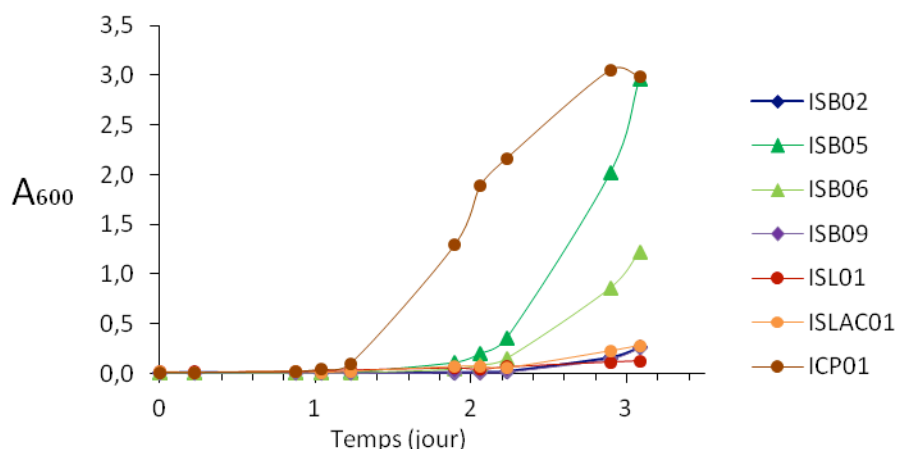


Figure 32. Courbe de croissance des microorganismes du cocktail E112 à 14°C.

Tableau. XIX :

Constantes caractéristiques de la phase exponentielle des souches E112 à 14 °C dans différents milieux.

	μ	G (h)	R	Latence	Milieu
ISB02	0,175	4	0,25	45,5	TS
ISB05	0,184	4	0,26	25	TS
ISB06	0,173	4	0,25	29,5	TS
ISB09	0,208	3	0,30	53,5	TS
ICP01	0,237	3	0,34	21	MRS
ISL01	0,039	18	0,06	25	MRS
ISLAC01	0,084	8	0,12	29,5	MRS

μ : Taux de croissance népérien; G : temps de génération (h); R : Taux de croissance horaire et L : Latence (j)

Tableau. XX :

Test d'inhibition de croissance de *Listeria innocua* et de *Flavobacterium psychrophilum* JIP02/06 sur boîte en milieu TS et FLP (\varnothing en mm) avec les surnageants de culture des différentes souches E112[®].

Souche probiotique	Inhibition <i>Listeria innocua</i>	Inhibition <i>F. psychrophilum</i>
<i>B. subtilis</i> ISB02	-	-
<i>B. amyloquefaciens</i> ISB05	9 mm	13 mm
<i>B. amyloquefaciens</i> ISB06	7,5 mm	7 mm
<i>Bacillus subtilis</i> ISB09	-	-
<i>P. acidilactici</i> ICP01	9 mm	15 mm
<i>L. rhamnosus</i> ISL01	17 mm	9 mm
<i>L. lactis</i> ISLAC01	-	12 mm
Milieu de culture frais (témoin)	-	-

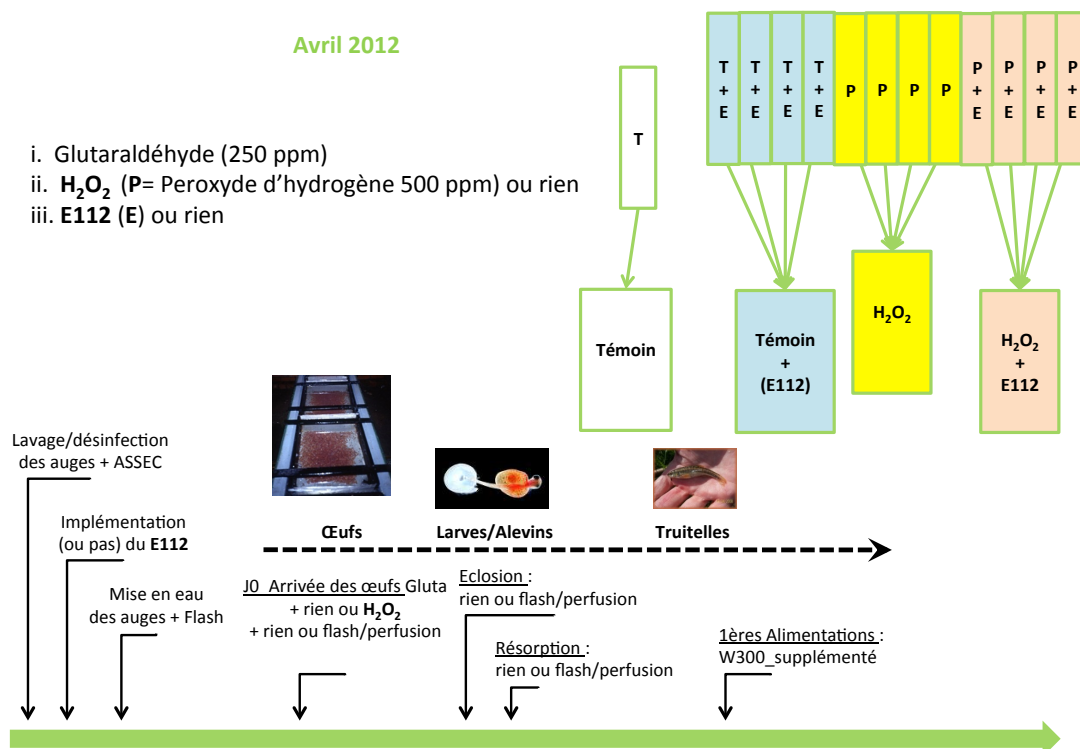
Comme précédemment, les traitements avec les molécules désinfectantes (= H₂O₂ et Incimaxx®) ont été réalisés dans des conditions définies par le « Guide des Bonnes Pratiques ». Il s'agissait de mettre en place des conditions de traitement suffisamment douces qui garantissaient la viabilité des œufs afin de ne pas impacter le plan de production du pisciculteur accueillant. Il se trouve que ces conditions (H₂O₂ 500 ppm, 30 min ; Incimaxx® 100 ppm, 20 min) sont relativement proches de celles pour lesquelles nous avons montré une activité bactéricide réelle sur *F. psychrophilum* (voir le Chapitre précédent). Effectivement, les traitements réalisés semblent avoir été efficaces pour désinfecter la surface des œufs des flores pathogènes potentiels car, en particulier, aucune flavobactérie n'a pu être détectée à partir des échantillons d'œufs traités.

Dans la mesure où aucune différence d'impact des traitements H₂O₂ vs Incimaxx® n'a été enregistrée, les animaux ont été regroupés en 4 lots (2 lots « Témoin » + 2 lots « E112® ») afin d'évaluer le seul effet de la présence d'E112®, en tant que traitement probiotique, sur l'apparition d'épisodes de flavobactériose.

Les observations réalisées révèlent un impact très limité du cocktail probiotique E112® sur le déclenchement d'épisodes infectieux. Néanmoins, une crise de yersiniose (Y) a été retardée sur les alevins nourris avec de l'aliment supplémenté avec de l'E112® par rapport aux alevins témoins (Figure 34). De même, un seul traitement à l'aliment médicamenteux contenant du florfénicol (= Nuflor) a été nécessaire pour traiter les lots « E112® », alors que deux traitements successifs ont été indispensables pour juguler les deux épisodes de flavobactériose déclarés sur les lots « Témoin ». L'analyse qPCR TaqMan duplex des prélèvements réalisés a permis de mettre en évidence la présence de poissons infectés (points oranges) approximativement entre deux semaines et cinq jours avant le déclenchement de la première et la seconde crise de flavobactériose, respectivement. Les taux d'infection de ces échantillons sont compris entre 10⁻⁴ à 10⁻⁶ copies d'*adnr16S*/copie de *β-actine*. Par ailleurs, les pesées réalisées quotidiennement sur le site par le pisciculteur n'ont par mis en évidence d'effet de l'E112® sur la prise de poids des poissons. L'indice de consommation ne semble donc pas impacté par l'E112®.

Une expérimentation analogue a été menée également avec l'E112® sur le site de Sore (Figure 35). Les œufs ont été simplement désinfectés au Roméiode puis divisés en six lots : 3 lots « Témoin » et 3 lots « E112® ». Les mortalités enregistrées à partir de février 2013 dans les 6 bassins sont présentées dans la figure 36 sous la forme d'une « HeatMap » : 0 à 50 morts/j : incolore ; 51 à 100 morts/j : jaune ; 101 à 200 morts/j : orange ; et > 200 morts/j : rouge. Les premières observations mettent en évidence des différences marquées dans les

Expérimentation sur le site de Légnacq MLE 1



Expérimentation sur le site de Légnacq MLE 2

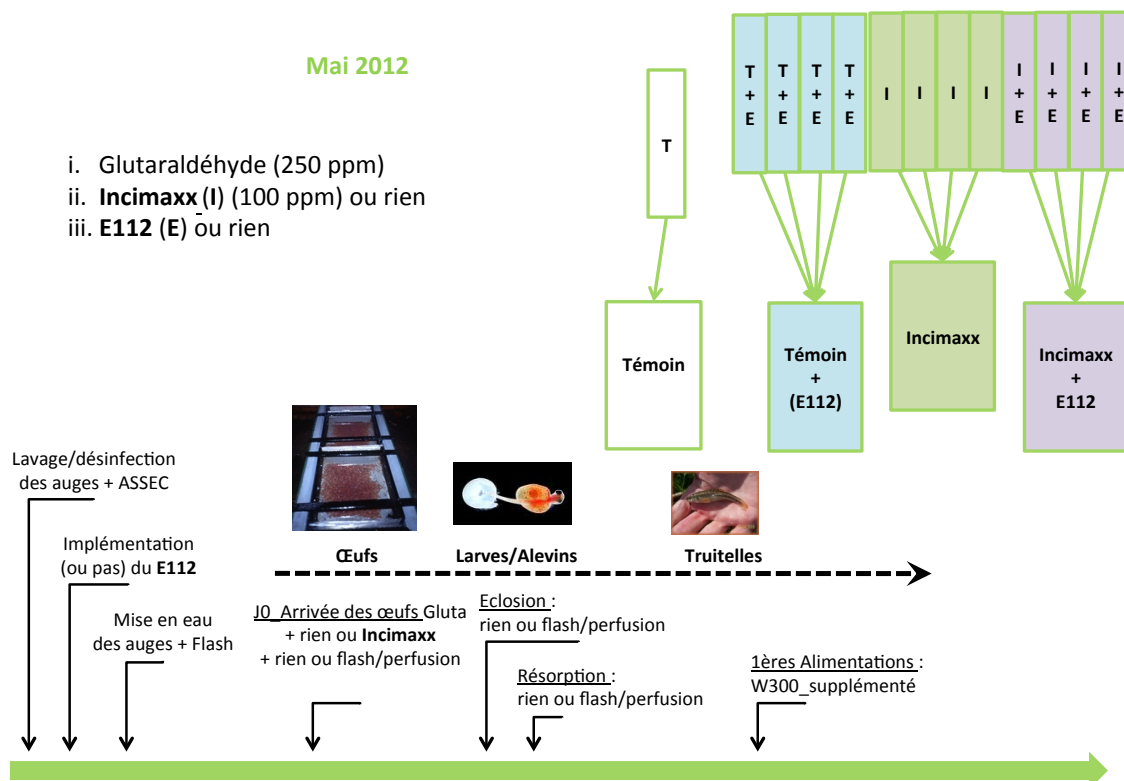


Figure 33. Schéma des plans d'expérience réalisés sur le site de Légnacq d'Avril (MLE 1) et Mai 2012 (MLE 2).

mortalités enregistrées dans des bassins dont les poissons ont été traités de la même manière. En raison d'une localisation géographique des bassins légèrement différente sur le site, il n'est pas possible d'exclure l'effet « bassin » sur l'état physiologique et/ou le comportement des poissons avec une incidence plus ou moins importante sur la résistance des animaux à la flavobactériose. Cet effet est de nature à « bruite » les observations collectées au cours de ce travail. Néanmoins, il a été possible de noter que, malgré la forte crise de mortalité de février dans le bassin B1 (mortalité > à 2.000 poissons), le cumul de mortalité des bassins traités avec l'E112® s'élevait à 11.385 animaux (≈ 150 morts/jours), légèrement plus faible à celui enregistré pour les bassins « Témoins » (14.429 animaux, ≈ 190 morts/jours). Ainsi, le nombre et l'intensité des crises sanitaires apparaissent moins fortes dans les bassins dans lesquels les poissons ont été traités avec l'« E112® ».

Des prélèvements réguliers d'échantillons ont permis de corréliser les crises de mortalité avec la présence de *F. psychrophilum* dans au moins un des trois organes testés, la rate, le rein ou, plus rarement, le foie. Pour la crise de début février dans le bassin 1, il n'a pas été identifié *F. psychrophilum* dans les échantillons d'alevins. On peut noter qu'il semble possible de détecter la flavobactérie (i) dans des échantillons de poissons avant que la mortalité enregistrée dans le bassin atteigne son maximum (ex. : Bassins 1 et 3 en début-mars ; Bassins 4 et 6 à la mi-février) mais également (ii) dans certains organes de poissons prélevés dans des bassins qui ont été traités avec le Selectan (Bassins 4 et 6 ; prélèvements du 7 Mars). Ces résultats soulignent la rémanence de l'infection à *F. psychrophilum* malgré le traitement antibiotique, un peu court, de 7 jours.

Afin de vérifier la présence réelle des micro-organismes du cocktail E112® chez les poissons traités, les combinaisons d'amorces (Bsub3F/Bsub3R : Gel I ; Lrha1F/Lrha1R : Gel II ; et Llac1F/ Llac1R : Gel III ; Figure 37) ont été testées sur de l'ADN génomique préparé à partir des différentes souches du cocktail (ISB02, ISB05, ISB06, ISB09, ISL01, ISLAC01, ICP01) puis ensuite sur de l'ADN préparé à partir d'intestin de truite. Les amorces semblent fonctionnelles et spécifiques de leur cible. Néanmoins, le couple Bsub3F/Bsub3R ne permet pas de discriminer les différentes espèces, et donc les différentes souches, de *Bacillus* (*B. subtilis*, souches ISB_02/ISB_09 vs *B. amyloliquefaciens*, souches ISB_05/ISB_06). Les couples d'amorces retenus pour détecter les *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens*), *L. lactis* et *L. rhamnosus* peuvent donc être utilisés pour rechercher ces souches du cocktail E112® dans les intestins des poissons. En revanche, les amorces Paci1F-Paci3R qui amplifient bien l'ADN de la souche de *P. acidilactici* qui constitue le Bactocell (Figure 31b) ne permettent pas la détection du pédiocoque souche ICP_01 présent dans l'E112. Il reste donc à concevoir un

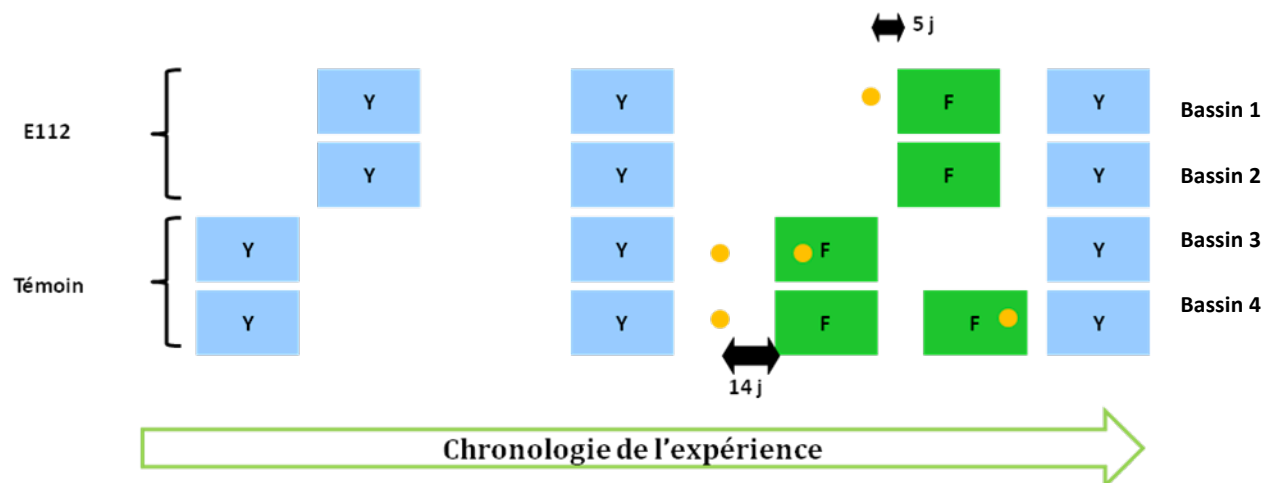


Figure 34. Enregistrement des épisodes infectieux au cours de l'expérimentation MLE 1-2 sur les lots de poissons traités (ou pas) avec l'E112, initié fin mars 2012 et terminé en septembre 2012. (Y : yersiniose ; F : flavobactériose).

Les carrés verts ou bleus indiquent les périodes de traitement au nuflor ou à l'ajusol, respectivement. Les points orangés indiquent les échantillons détectés positifs à la qPCR TaqMan duplex *adnr 16S/β-actine*.

Expérimentation sur le site de Sore ASO 3

Décembre 2012

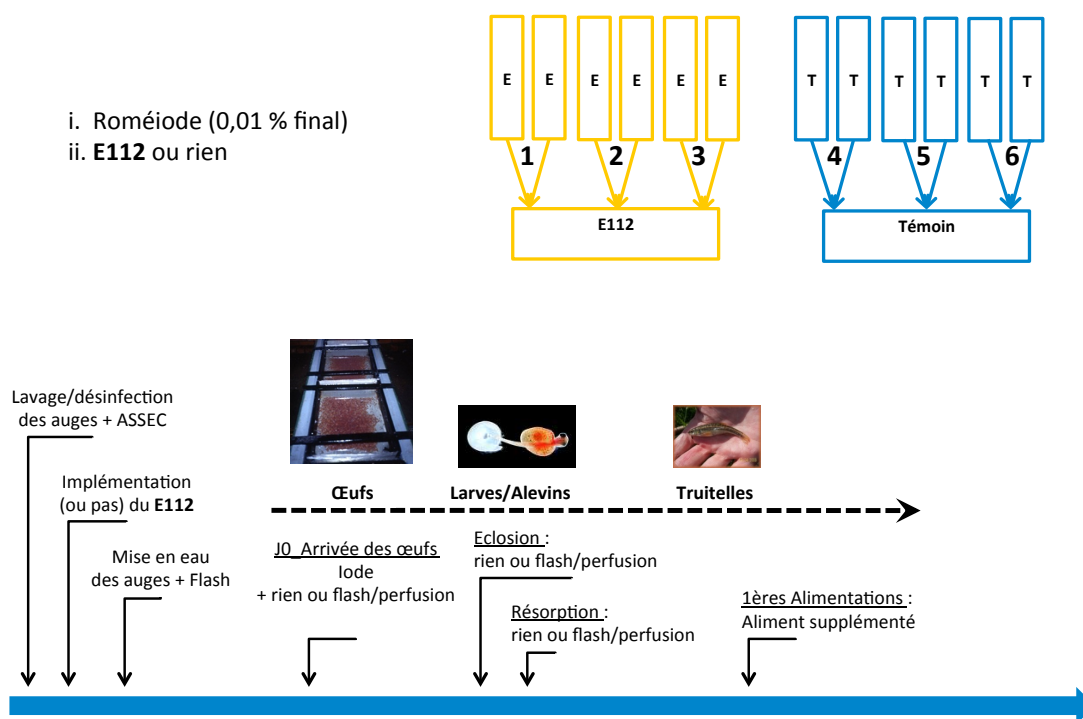


Figure 35. Schéma du plan d'expérience réalisé sur le site de Sore (Landes).

nouveau couple d'amorces fonctionnelles et spécifiques pour amplifier l'ADN de cette souche.

f. Analyse de l'expression chez la truite de gènes de l'immunité et de stress

Au cours de ce travail, nous avons cherché à évaluer l'impact possible de la flore E112® sur l'expression d'un certain nombre de gènes chez la truite d'élevage prélevée au cours de l'expérimentation Sore 3. Il s'agissait en particulier de savoir si les immunités spécifique et non-spécifique sont stimulées par ce cocktail microbien. L'expression des gènes sélectionnés rend compte de l'activité du système immunitaire innée (*c3*), du système acquis (*igm*) et du stress oxydant généré par la réponse immunitaire (*mta*). Les mesures d'expression des ces gènes chez les poissons des lots « Témoins » et « E112® » sont évaluées par rapport à l'expression des gènes de ménage *gapdh* et *ef1α*. Les résultats obtenus avec des poissons sont consignés dans le tableau XXI. Ce travail sur l'expression génique n'a pas mis en évidence d'impact significatif du cocktail E112®. Toutefois, on peut noter aux 84^e et 91^e jours post-éclosion la surexpression du gène qui code l'IgM dans la rate des animaux alimenté avec la flore E112®. Ces micro-organismes pourraient participer à une meilleure réactivité du système immunitaire des poissons en cours d'infection à J₈₄ et J₉₁.

Kim et coll (2006) ont montré que chez un certain nombre d'animaux y compris les poissons, le taux circulant d'immunoglobulines est augmenté lors de l'apport en probiotiques dans l'alimentation. Ainsi, l'administration orale de la bactérie *Clostridium butyricum* chez la truite arc-en-ciel renforce la résistance du poisson à la vibriose via l'augmentation de l'activité phagocytaire des leucocytes (Sakai et coll., 1995). Cette activité phagocytaire contre *Vibrio anguillarum* est observée seulement deux semaines après le début du mode d'alimentation supplémentation en probiotique (Sharifuzzaman et coll., 2009). De même, *P. acidilactici*, en tant qu'additif alimentaire stimule l'activité du complément chez *Aequidens rivultatus*, sur une période de 56 jours (Neissi et coll., 2013). D'autres probiotiques tels que *L. rhamnosus*, *E. faecium* et *B. subtilis* permettent de réguler l'expression des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL- 1β et TGF β dans la rate et les reins chez *O. mykiss* (Panigrahi et coll., 2007).

Ainsi, il a été montré que les probiotiques jouent un rôle bénéfique sur les poissons hôtes car ils permettent de stimuler le système immunitaire des animaux aquatiques et d'induire une réponse par divers mécanismes comme l'activation de la phagocytose ou du système du complément (Akhter et coll., 2015).

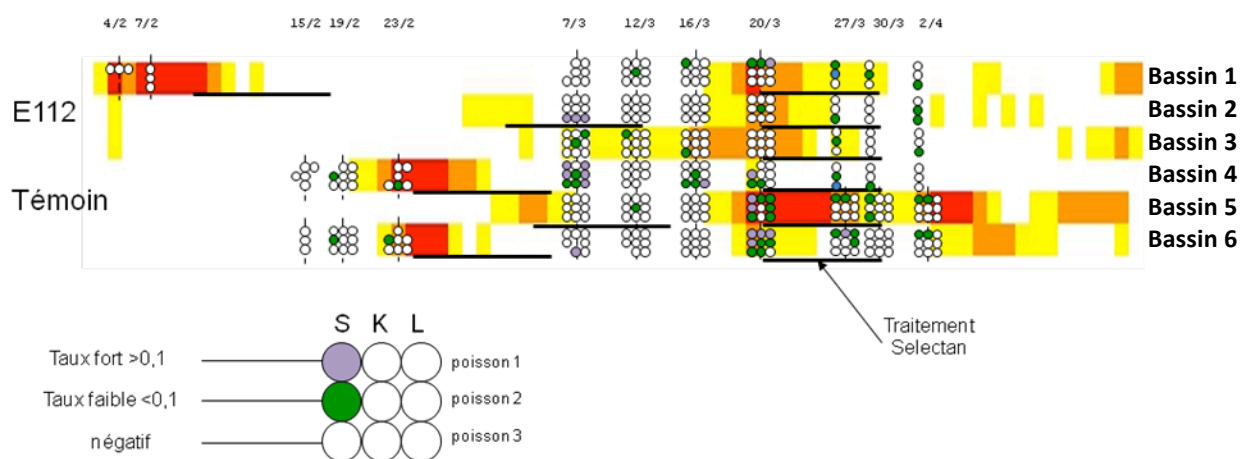


Figure 36. Heatmap de l'enregistrement des mortalités journalières des poissons bassin par bassin.

Six bassins ont été suivis sur une période de 3 mois, les poissons sont nourris par une alimentation standard (bassins 4, 5 et 6) ou une alimentation supplémentée avec le cocktail probiotique E112 (bassins 1, 2 et 3). Le code couleur utilisé pour exprimer les mortalités est le suivant : 0 à 50 morts/j : incolore ; 51 à 100 morts/j : jaune ; 101 à 200 morts/j : orange ; et > 200 morts/j : rouge. La prévalence de l'infection à *F. psychrophilum* estimée par qPCR TaqMan duplex dans des organes prélevés sur trois truites distinctes par bassin et par journée de prélèvement. S : rate ; K : rein ; L : foie ; les segments horizontaux noirs correspondent au Selectan : antibiotique florfenicol.

4. Conclusion

Les résultats collectés au cours de cette partie du travail confirment l'importance du portage de *F. psychrophilum* dans les fermes aquacoles. A l'aide de la qPCR TaqMan duplex que nous avons développée, nous avons été en mesure d'identifier l'agent pathogène sur tous les sites étudiés avec des taux d'infection assez variables d'un site à l'autre et d'un animal à l'autre. Il faut noter que certains poissons identifiés comme porteurs de *F. psychrophilum* ne présentaient pas tous les signes cliniques de la flavobactériose (ulcères, nécroses, anémies, inflammations de la rate, ...). Alors que ces animaux ont subi au cours de l'itinéraire de production un certain nombre de traitements avec de l'aliment médicamenteux, ils présentent malgré tout un taux d'infection résiduel, insuffisant pour provoquer la maladie au temps t, mais suffisant pour que celle-ci éclate à l'occasion d'une dégradation/perturbation du milieu, d'une infection par un agent pathogène secondaire, d'un stress de manipulation, etc ... Plusieurs hypothèses pourraient donner sens à cette observation dont les suivantes : (i) les souches de *F. psychrophilum* présentes sur le site deviendraient résistantes à l'action de l'antibiotique ; cette hypothèse est peu crédible dans la mesure où les épisodes infectieux qui provoquent des mortalités importantes sont encore maîtrisés de manière efficace par l'alimentation médicamenteuse. (ii) La durée du traitement antibiotique (5 à 8 jours) serait trop courte pour débarrasser les poissons infectés de tous les agents infectieux ; il est vrai que les durées de traitement enregistrées, conformes aux prescriptions, paraissent parfois un peu courtes pour atteindre cet objectif. (iii) Les animaux traités à l'arrêt du traitement antibiotique sont contaminés à nouveau par l'agent pathogène présent sur site sous une forme quelconque de résistance (ex. biofilm) ou véhiculé par l'eau amont, adsorbé sur de la matière en suspension. Les charges en flavobactérie les plus importantes ont été mesurées dans le rein et la rate chez les animaux atteints par la forme interne de la maladie. Ces deux organes assurent des fonctions physiologiques clés pour le poisson dans l'épuration sanguine et dans la maturation des cellules du système immunitaire. Les différences de virulence entre la forme interne et externe ne sont pas connues. Il pourrait s'agir de souches de *F. psychrophilum* différentes qui s'installent dans tels ou tels organes ou de souches identiques mais qui expriment des facteurs de virulence distincts en fonction de paramètres qui restent à identifier.

L'objectif principal de cette partie de travail consistait à imposer, à partir du stade œuf, la présence d'une flore (Bactocell® ou du cocktail E112®) afin de limiter le développement d'agents pathogènes, dont *F. psychrophilum*. Les deux flores ont bien été retrouvées sur les animaux traités et aucune des deux n'a modifié significativement les performances

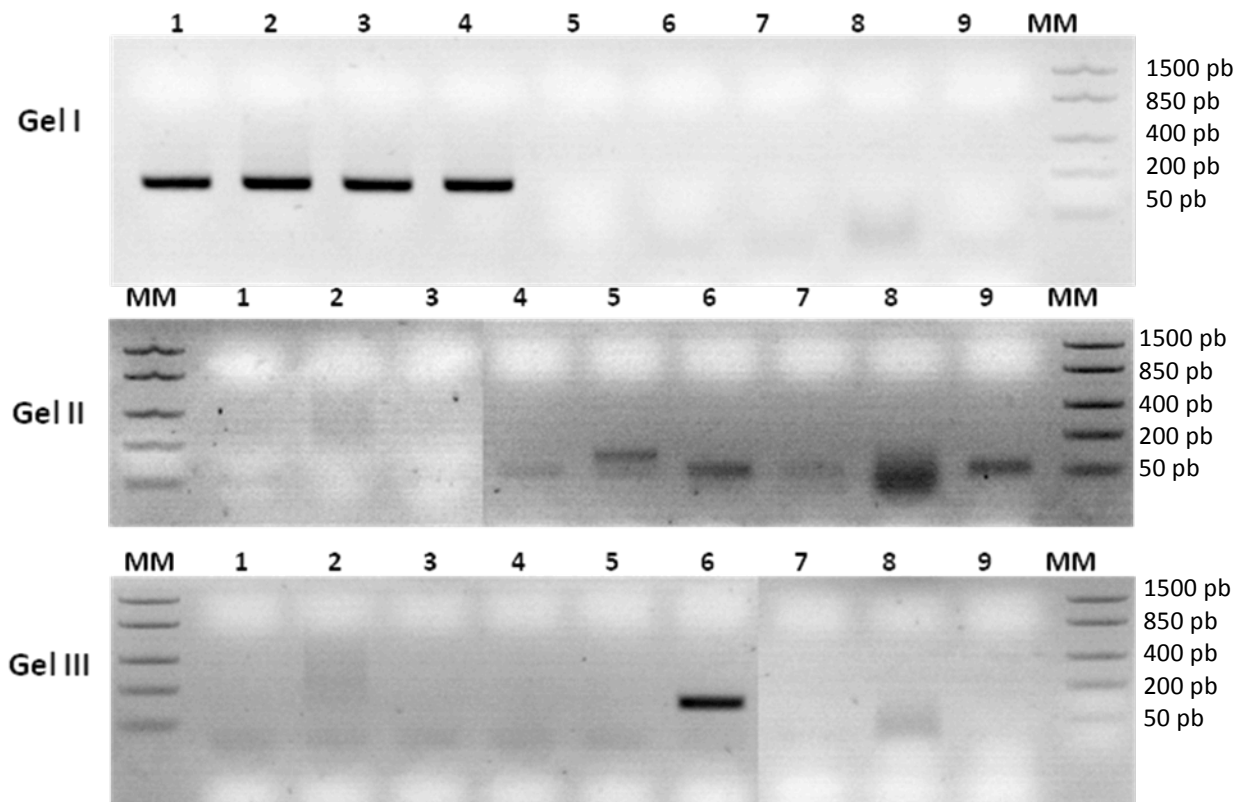


Figure 37. Analyse par électrophorèse en gel d'agarose des amplifiats obtenus à partir de l'ADN génomique des différentes souches du cocktail E112®.

Le gel I a été réalisé avec le couple d'amorce Bsub3F et Bsub3R, le gel II : Lrha1F/Llrha1R et le gel III Llac1F/Llac1F. Les puits numérotés pour les différents gels correspondent aux différentes souches en 1 : *B. subtilis* ISB02; 2 : *B. amyloquefaciens* ISB05; 3 : *B. amyloquefaciens* ISB06; 4 : *B. subtilis* ISB09; 5 : *L. rhamnosus* ISL01 ; 6 : *L. lactis* ISLac01; 7 : *P. acidilactici* ICP01; 8 : Bactocell et 9 : témoin négatif (eau).

zootechniques enregistrées. En revanche, elles ont, à des degrés divers entre les sites géographiques retenus ou entre les bassins intra-sites, retardé ou limité l'intensité des crises de mortalité liées aux infections microbiennes. Ainsi, le lot de truites traité au Bactocell® a été épargné par des épisodes de flavobactériose sur le site de Touvre alors que des mortalités jusqu'à 200 alevins/jour étaient enregistrées sur le lot « Témoin ». Le Bactocell® semble ici avoir joué un rôle protecteur des poissons vis à vis de l'infection. Dans le cadre de l'expérimentation réalisé sur le site de Sore, l'effet inverse est observé. Les poissons nourris avec de l'aliment supplémenté en Bactocell présentent une mortalité supérieure à celle observée pour les poissons témoin. Dans le cas de l'E112®, ce cocktail a retardé une crise de yersiniose ou limité le nombre et l'intensité des crises de flavobactérioses. Dans la mesure où les micro-organismes qui constituent les cocktails testés sont connus pour avoir des propriétés immunostimulantes, nous avons cherché à quantifier les niveaux d'expression de certains gènes de l'immunité chez les poissons traités vs chez les poissons témoins. Aucune différence significative n'a été mise en évidence suggérant un simple rôle physique (= barrière) pour les souches bactériennes utilisées au cours de cette étude. Néanmoins, le nombre d'échantillons qui ont pu être analysés est probablement très insuffisant pour exclure définitivement des interactions plus étroites entre l'hôte traité et la flore utilisée. Des expériences terrains complémentaires sont nécessaires pour conforter ou infirmer ces observations. Ce type d'expérimentation reste difficile à mettre en œuvre. Il s'agit en effet d'expérimenter dans des conditions les plus proches possibles de celles du pisciculteur sans que le plan d'expérimentation n'impacte le cycle commercial de la production. Une alternative séduisante consisterait à réaliser des infections de poissons avec *F. psychrophilum* en milieu contrôlé afin d'évaluer de manière rigoureuse l'efficacité des apports alimentaires de flores probiotiques pour contrôler l'infection. Néanmoins les essais d'infections restent encore aujourd'hui trop peu reproductibles.

Une autre approche de lutte biologique pour protéger les poissons des infections à *F. psychrophilum* consiste à utiliser des bactériophages dans les élevages de salmonidés. Ainsi, une vingtaine de phages ont été isolés à partir de fermes aquacoles danoises (Stenholm et coll., 2008). Ils présentent des propriétés lytiques intéressantes et de larges spécificités d'hôtes vis-à-vis des souches de *F. psychrophilum*. La survie du phage PFpW3 isolé à partir d'eau d'étang de fermes japonaises a été montrée ainsi que la stabilité de son infectiosité (Kim et coll., 2010). Ces caractéristiques ont été confirmées sur de nombreux autres phages testés dans des conditions environnementales variées observées *in vivo* ou reconstituées *in vitro* (Madsen et coll., 2013). Alors qu'une incubation à pH acide (≤ 3) réduit drastiquement

Tableau XXI:

Taux d'expression de gènes marqueurs de la réponse immunitaire dans les différents organes de truites
alimentées avec ou sans cocktail E112®.

Jours post- éclosion	Traitement	Gène	Rein		Rate	Foie
78	E112	C3				1,5 ± 1,1 n.s
84	E112					1,6 ± 0,8 n.s
91	E112					2,2 ± 1,2 n.s
78	Témoin					1,3 ± 0,9 n.s
84	Témoin					1,3 ± 1,2 n.s
91	Témoin					1,8 ± 1,2 n.s
78	E112	mta	1,6 ± 0,9	n.s		3,1 ± 2,8 n.s
84	E112		2,5 ± 1,5	n.s		1,9 ± 1,1 n.s
91	E112		4,3 ± 4,0	n.s		4,6 ± 4,8 n.s
78	Témoin		1,4 ± 1,3	n.s		1,3 ± 1,4 n.s
84	Témoin		1,4 ± 3,1	n.s		1,5 ± 1,4 n.s
91	Témoin		1,0 ± 0,4	n.s		1,7 ± 2,4 n.s
78	E112	igm	1,2 ± 2,0	n.s	5,2 ± 4,8	n.s
84	E112		3,2 ± 3,4	n.s	15,6 ± 12,7	n.s
91	E112		8,5 ± 4,1	n.s	9,3 ± 9,9	n.s
78	Témoin		1,0 ± 1,9	n.s	11,0 ± 12,6	n.s
84	Témoin		2,3 ± 2,4	n.s	1,0 ± 0,7	n.s
91	Témoin		1,2 ± 0,5	n.s	3,3 ± 2,4	n.s

p > 0,05; n.s : non significatif

l'infectiosité des phages, celle-ci est pas ou très peu ($-1 \log_{10}$) impactée par une conservation des particules virales à -80 °C en présence de glycérol, à 20 °C sous la forme d'une suspension ou déshydratées/adsorbées sur des granulés alimentaires, respectivement. Très récemment, un travail portant sur la diversité et la répartition géographique des isolats de *F. psychrophilum* et de leurs phages a permis d'identifier à l'échelle locale des communautés caractéristiques « phages/hôtes » tout en mettant en évidence certaines constantes à l'échelle de la planète du schéma d'infection des phages. Ces observations confortent l'intérêt de la thérapie phagique dans le biocontrôle de la maladie de l'eau froide et du syndrome de l'alevin de la truite arc-en-ciel, dans laquelle les phages pourraient être apportés *via* l'aliment.

CHAPITRE VI

FAISABILITÉ D'UN VACCIN PROTECTEUR CONTRE

LE PATHOGÈNE

1. Introduction

Pour éviter le recours aux traitements antibiotiques, un certain nombre de vaccins ont été développés depuis une vingtaine d'années pour lutter contre les bactéries pathogènes de poissons d'élevage. La Norvège privilégie l'approche « vaccination » pour limiter les maladies infectieuses bactériennes de poissons (Bowden et coll., 2013). Systématiquement, les saumons atlantiques (*Salmo salar*) et les truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) sont vaccinés contre *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida* et *Aeromonas salmonicida* (Håstein et coll., 2005).

A ce jour, il n'existe pas de vaccin commercial pour prévenir les infections à *F. psychrophilum*. De nombreuses recherches pour contrôler les flavobactérioses hivernales s'orientent vers des approches biotechnologiques qui semblent prometteuses pour produire des traitements à bas coûts à travers l'utilisation de bactériophages (Stenholm et coll., 2008) ou de flavobactéries atténuées (LaFrentz et coll., 2008). Néanmoins, ces nouvelles approches impliquent la dissémination non autorisée d'organismes vivants dans le milieu naturel. L'approche vaccin reste donc d'actualité. Des tentatives de vaccination expérimentale ont été réalisées par des injections intrapéritonéales d'inocula variés, souvent constitués de cellules entières inactivées, en présence ou non d'adjuvant (Fredriksen et coll., 2013). Ainsi, des saumons coho de 5 à 25 g sont protégés de l'infection après une injection de bactéries de *Cytophaga psychrophila* inactivées par le formol en présence d'adjuvant complet de Freund (pourcentage relatif de survie, RPS de 100 %, Holt, 1987) alors qu'une préparation de bactéries inactivées par la chaleur ne protège que partiellement (RPS de 80 %) des saumons de 2,2 g (Obach et coll., 1991). L'importance du rôle de l'adjuvant dans la production d'anticorps et dans la protection a été soulignée par une étude réalisée chez l'ayu (Rahman et coll., 2003). L'injection de cellules entières inactivées au formol administrées en présence d'adjuvant conduit à une bien meilleure protection (RPS de 60 %) corrélée à une augmentation de la synthèse d'anticorps anti-*F. psychrophilum* qu'en absence d'adjuvant (RPS de 40 %). Des résultats analogues ont été obtenus chez la truite arc-en-ciel (Madetoja et coll., 2006 ; Högfors et coll., 2008). Dans les préparations inactivées, il n'est jamais exclu que des survivants dérivent de l'inoculum. Aussi, il est préférable de privilégier une approche « vaccin » dans laquelle la sous-unité antigénique est constituée de fractions subcellulaires de *F. psychrophilum* (Rahman et coll., 2002 ; LaFrentz et coll., 2004). Il a été montré que non seulement une fraction enrichie en protéines de la membrane externe (OMPs) protège la truite arc-en-ciel et l'ayu, mais également que cette protection est plus efficace que lorsque l'immunisation est réalisée avec une suspension de flavobactéries simplement inactivées

dans du formol (Rahman et coll., 2002). Il restait donc à identifier et à caractériser les protéines membranaires qui sont réellement impliquées dans l'immunoprotection observée. Crump et coll. (2001) ont analysé et caractérisé les antigènes de surface de *F. psychrophilum*. Deux antigènes dominants (le LPS, environ 16 kDa ; l'antigène-O, environ 100 kDa) ont été détectés à l'aide de sérums de truites convalescentes. Plus récemment, un troisième antigène (FspA, « *F. psychrophilum* specific antigen » ; 20 kDa) reconnu par le système immunitaire de l'hôte a été identifié chez *F. psychrophilum*. Il pourrait s'agir d'une adhésine en raison de 36 % d'homologies de séquence entre FspA et l'adhésine de *Yersinia pseudotuberculosis* (Crump et coll., 2005). Par ailleurs, un inventaire des protéines de la membrane externe de *F. psychrophilum* a permis d'identifier des protéines cibles candidates dans la mise au point d'un vaccin (Dumetz et coll., 2008). Deux d'entre elles (OmpA/P60, Merle et coll., 2003 ; OmpH/P18, Massias et coll., 2004) induisent une immunoprotection chez la truite arc en ciel (Dumetz et coll., 2006, 2007).

Plus récemment, l'approche de la vaccinologie inverse a été mise à profit pour cibler des candidats vaccins à partir de l'analyse informatique du génome de *F. psychrophilum* (Plant et coll., 2011-2014 ; Kato et coll. 2014). En particulier, les produits d'expression de gènes qui codent des composants (*Gld*) probablement impliqués dans la motilité de *F. psychrophilum* ont été ciblés en raison de leur appartenance possible à un système de sécrétion de type III-like (PorSS ; Sato et coll., 2010). Les essais de vaccination avec des bactéries recombinantes qui expriment GldN inactivées se sont révélés encourageants lors d'une première expérimentation puis décevants lors de deux nouvelles études dans la protection des poissons à l'infection avec *F. psychrophilum* (Plant et coll., 2014). Ces difficultés ne remettent pas en cause l'intérêt de l'approche qui consiste à cibler par bioinformatique des candidats vaccins en s'affranchissant d'études longues et fastidieuses sur la sélection et la caractérisation d'immunogènes ; elles soulignent néanmoins, (i) les paris réalisés sur tel ou tel candidat mais surtout (ii) la non-reproductibilité du modèle d'infection par *F. psychrophilum* en système contrôlé.

Dans le cadre de ce projet, nous avons dans un premier temps sélectionné cinq souches de *F. psychrophilum* fraîchement isolées du terrain et potentiellement représentatives de la diversité antigénique présente sur les sites piscicoles aquitains. Dans un deuxième temps, nous avons préparés deux cocktails antigéniques distincts à partir de ces souches : (i) une suspension bactérienne inactivée au formol « Autovaccin » et (ii) une suspension « membrane externe » (OMPs). Enfin, nous avons cherché à éprouver sur un site

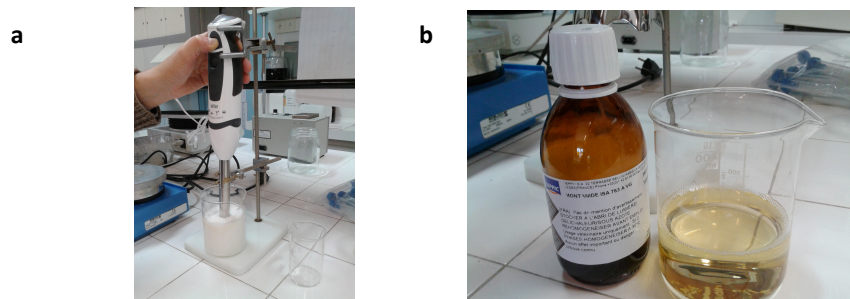


Figure 38. Préparation du cocktail injection « OMPs » (a) à partir de l'adjuvant Montanide™ ISA 763 A VG (b).

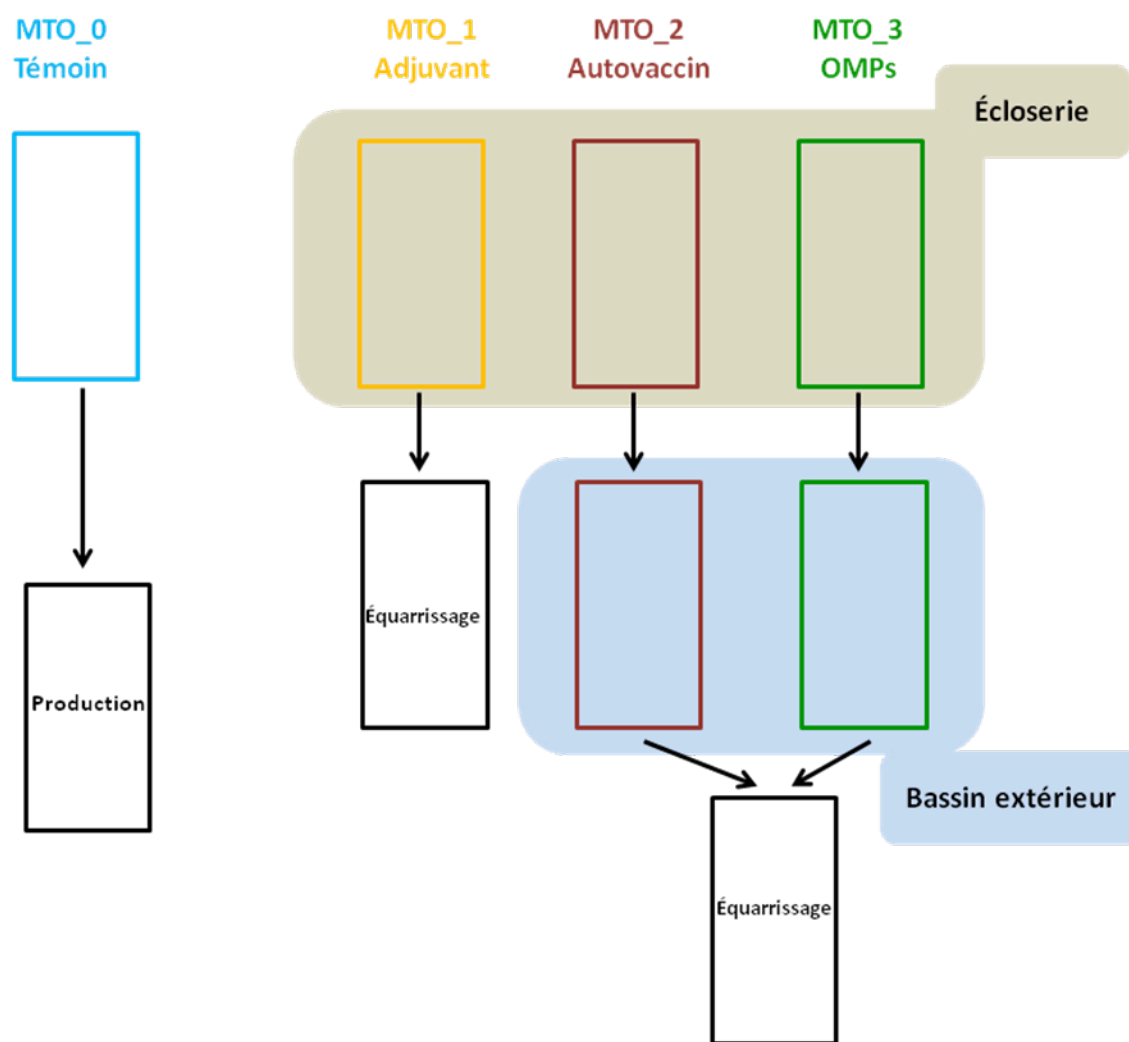


Figure 39. Dispositif expérimental du programme de vaccination réalisé à Touvre (Charente).

piscicole ces préparations vaccinales pour leur capacité à protéger les poissons vaccinés de la flavobactériose

2. Matériel et méthodes

a. Sélection des souches *F. psychrophilum* isolées des sites piscicoles aquitains

Parmi les 55 souches fraîchement isolées au cours de la campagne de prélèvement 2012-2013, les cinq souches suivantes ont été retenues car identifiées (i) abondamment à partir de poissons malades et (ii) dans des sites piscicoles aquitains distincts : site de Pissos : PISK08 ; site de Sarrance : SESB02 ; site de Touvre : MTOB07 ; site de Sore : ASOK05 ; site de Lévigacq : MLEB15.

Les 5 souches ont été cultivées individuellement dans le milieu FLP. En fin de phase exponentielle de croissance ($A_{600} = 0,8-1,0$), les cellules ont été centrifugées puis lavées avec du tampon PBS.

b. Préparation de différentes fractions de *F. psychrophilum*

Les enveloppes membranaires OMPs

Les flavobactéries en culture proches de la fin de la phase exponentielle de croissance ($A_{600} \approx 0,5$) sont centrifugées ($8.000 \times g$, 15 min, 4 °C) puis lavées deux fois avec du tampon PBS (NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; KH_2PO_4 1,5 mM ; Na_2HPO_4 8,1 mM ; pH 7,4) afin de prévenir la lyse prématurée des bactéries. A l'issue de la dernière centrifugation, les cellules sont reprises dans de l'eau milliQ afin de potentialiser l'éclatement des bactéries en présence du fluorure de phényl méthyl sulfonide (PMSF) 0,4 mM ou d'un cocktail d'inhibiteurs des sérines-protéases (Roche : 250 μL pour 25 mL d'eau). La lyse bactérienne est réalisée par ultrasons (10 Watts, Sonicateur Vibra cell 75185) à 4 °C : 10 cycles d'une minute séparés par une minute de refroidissement. A partir de cette étape, les manipulations doivent être réalisées à une température proche de 0 °C afin de garantir l'intégrité des protéines membranaires. Il s'agit de limiter au maximum l'action des protéases (température optimale d'activité catalytique ≈ 14 °C). Une ultracentrifugation ($260.000 \times g$, 15 min, 4 °C) permet de séparer les enveloppes membranaires (membrane externe, membrane plasmique, membrane « mixte ») de la fraction soluble (cytoplasme + périplasme). Le culot contenant les enveloppes est lavé deux fois au PBS puis repris dans un petit volume de tampon (environ 5 mL). La suspension « enveloppe » est ajustée à 10 mg de



Figure 40. Les différentes phases du protocole de vaccination par immersion (a) ou par injection (b) après passage des poissons dans un bain d'anesthésiant (c).

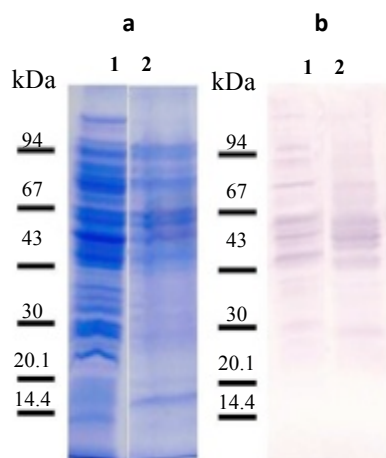


Figure 41. Profils électrophorétiques des fractions « enveloppe » et « membrane externe » préparées à partir de *F. psychrophilum*.

Echantillons : 20 μ g de protéines membranaires de la fraction « enveloppe » (1) ou de la fraction « membrane externe » (2). Les protéines sont révélées après coloration au bleu de Coomassie R-250 (a) ou après immunomarquage à l'aide d'un sérum de truite convalescente de la flavobactériose (b). Les distances de migrations sont comparées à celles des marqueurs de taille moléculaire.

protéines membranaires/mL après avoir réalisé un dosage des protéines par la méthode de Lowry, puis stockée à - 80 °C.

Les membranes externes OMPs

Le Sarkosyl (laurylsarcosinate de sodium) est un détergent ionique qui a la propriété de solubiliser sélectivement les protéines de la membrane plasmique alors que la membrane externe des bactéries est préservée. La suspension « enveloppe » a été traitée avec du Sarkosyl à 2 % (p/v final) : 10 mL d'"enveloppes" (5 mg/mL) avec 10 mL de Sarkosyl à 4 % dans du tampon PBS. Un traitement aux ultra-sons (3 cycles de 30 secondes de lyse, 24 Watts, Sonicateur Vibra cell 75185) séparé par une minute de refroidissement dans de la glace favorise la dissolution des protéines. La préparation est agitée pendant 1 heure à 4 °C à l'aide de barreau magnétique puis incubée une heure en présence de formaldéhyde à 1 %. Dans la mesure où cette préparation « membrane externe » sera utilisée ultérieurement pour constituer l'inoculum d'un vaccin expérimental, cette étape est nécessaire afin de s'assurer de l'absence de *F. psychrophilum* viables résiduelle. Ensuite, la fraction membranaire insoluble dans le Sarkosyl (majoritairement de la membrane externe) est collectée par ultracentrifugation ($260.000 \times g$, 15 min, 4 °C). Après élimination du surnageant, les membranes sont dispersées dans du tampon PBS à l'aide des ultrasons (10 watts ; quelques secondes). Les traces de Sarkosyl que contaminent la fraction « membrane externe » sont éliminées par 10 lavages successifs avec du tampon PBS. Au dernier lavage, la préparation est reprise dans du tampon PBS. Un aliquot de 25 µL est étalé sur boîte de Pétri (gélose FLP) à 14 °C afin de contrôler l'absence de *F. psychrophilum* survivante. De même un test de viabilité EMA (éthidium bromide monoazide 5 mg/mL, Sigma Aldrich) a été réalisé afin de s'assurer de l'absence de survie bactérienne. La préparation antigénique a été ajustée à 5 mg/mL dans 300 mL de tampon PBS.

c. Préparation des cocktails antigéniques

Un premier cocktail « Autovaccin » a été préparé par la Société Biovac Santé Animale (Hubert Gantelet, Beaucouzé, Maine & Loire) à partir d'une prescription vétérinaire (Mathieu Jamin, St Martin de Champs, Finistère). En raison d'une contamination apparente de la souche MLEB15, seules les 4 autres souches ont intégrées le cocktail pour aboutir à la préparation de deux versions de l'autovaccin : une première pour l'immunisation par balnéation et une seconde pour l'immunisation par injection.

Un second cocktail « OMPs » a été préparé à Bordeaux Sciences Agro. Les flavobactéries préparées précédemment ont été lysées aux ultra-sons (3 cycles de 30 sec de lyse à 24 Watts séparés d'1 min de refroidissement à 4 °C) puis les protéines du lysat ont été dosées par la méthode de Lowry. Les 5 préparations ajustées à 50 mg de protéine/mL ont ensuite été mélangées (1 mL de chaque souche) puis traitées avec du Sarkosyl à 2 % final. Après une étape de dispersion rapide aux ultra-sons (10-20 sec ; 24 Watts), le mélange a été agité pendant 60 min à 4 °C, traité avec du formaldéhyde à 1 % (60 min à 4 °C) afin de s'assurer de l'absence de flavobactéries survivantes. La fraction insoluble (= membrane externe) dans le Sarkosyl a été récupérée par ultracentrifugation (85.000 rpm, 15 min, 4 °C) puis lavée 10 fois avec du tampon PBS puis finalement dispersée dans 300 mL de PBS.

A partir de cette suspension « Membrane Externe », deux émulsions ont été préparées afin d'obtenir les inocula « Immersion » et « Injection ». L'inoculum « Immersion » est obtenu en mélangeant 30 mL de la suspension « Membrane Externe » dans 30 mL d'adjuvant Montanide™ IMS VG (nanoparticules hydrosolubles) fourni gracieusement par la société SEPPIC (Puteaux, Hauts de Seine). Après une étape d'agitation d'une heure sous agitation magnétique, le cocktail immunisant peut être conservé jusqu'à un mois à 4 °C avant utilisation. Le second inoculum « Injection » est de 60 mL de la suspension « Membrane Externe » qui est dispersée dans 140 mL d'adjuvant Montanide™ ISA 763 A VG afin de réaliser une émulsion eau/huile après une agitation vigoureuse à l'aide d'un mixeur de type Braun MQ300 (3 min ; vitesse 6). La préparation reste stable pendant un mois à 4 °C et directement injectable (Figure 38).

Le 3^e cocktail « Adjuvant » contient uniquement une émulsion constituée de Tampon PBS et de Montanide™ IMS VG ou ISA 763 A VG.

d. Essais de vaccination des poissons

Les essais de vaccination ont été réalisés sur le site de Touvre. Le site a réceptionné les œufs la dernière semaine de Février et, après éclosion et résorption de la vésicule vitelline, l'alimentation des alevins a débuté à la mi-Mars. A la mi-avril, 3.000 individus ont été prélevés puis répartis dans 3 bassins en fonction de l'administration futur des cocktails vaccinaux : MTO_1, « Adjuvant » ; MTO_2, « Autovaccin » ; et MTO_3, « OMPs ». Le quatrième lot (MTO_0, Groupe « Témoin ») regroupe l'ensemble des poissons destinés à la production du site. La première immunisation par balnéation a été réalisée le 30 avril sur des animaux de 3 g puis la seconde immunisation par injection s'est déroulée le 28 juin sur des truitelles de poids moyen de 15 g. Le dispositif expérimental est résumé dans la figure 39.

Pour l'immunisation par immersion, les 30 mL des cocktails préparés précédemment ont été dispersés dans 270 mL d'eau. Le contact avec les alevins, par petits lots de 50 individus, a été réalisé dans un bécher de 500 mL pendant une minute (Figure 40).

Lors de la vaccination par injection, les truitelles ont été mises à la diète la veille de l'inoculation. Le lendemain, les animaux ont été anesthésiés pendant 2 minutes dans un bain d'iso-eugénol (5 mL pour 90 L d'eau) oxygéné à l'aide de bulleurs. Les poissons ont été ensuite vaccinés individuellement par injection d'un des trois cocktails préparés précédemment.

3. Résultats et discussion

a. Identification des protéines « immuno-réactives »

Les enveloppes de *F. psychrophilum* JIP02/86 (Membranes plasmique + externe) ont été préparées à partir d'un lysat cellulaire. Après plusieurs lavages permettant d'éliminer les contaminants du cytoplasme et du périplasme, le culot membranaire a été repris dans un petit volume de tampon puis analysé par SDS-PAGE. Les protéines membranaires séparées sont révélées au bleu de Coomassie R-250 (A, piste 1) ou après immunomarquage (B, piste 1) à l'aide d'un sérum collecté sur une truite arc-en-ciel convalescente de la flavobactériose. L'électrophorégramme permet d'identifier une trentaine de bandes protéiques dans les enveloppes de la flavobactérie avec des poids moléculaires apparents compris entre 10 et 100 kDa. L'immunoélectrophorégramme révèle que seule la moitié de la population protéique est immunoréactive. On peut noter la présence de marquages intenses au niveau de protéines ayant une masse moléculaire comprise entre 40 et 65 kDa. Aussi, nous avons cherché à savoir si les molécules immunodominantes repérées précédemment, sont des protéines de la membrane externe. La méthode classique pour séparer la membrane externe de la membrane plasmique, pour les bactéries Gram négatives, exploite la différence de densité des deux membranes observée après ultracentrifugation dans un gradient de saccharose. Pour *F. psychrophilum*, cette approche n'a pas fonctionné pour obtenir une fraction « membrane externe » correcte. Nous avons donc exploité la capacité du Sarkosyl à solubiliser sélectivement les protéines de la membrane plasmique à partir d'une suspension d'enveloppes comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes. La fraction « Membrane Externe » obtenue a été analysée par électrophorèse (Figure 41). Elle contient une quinzaine de protéines qui, pour la plupart, sont toutes immunoréactives.

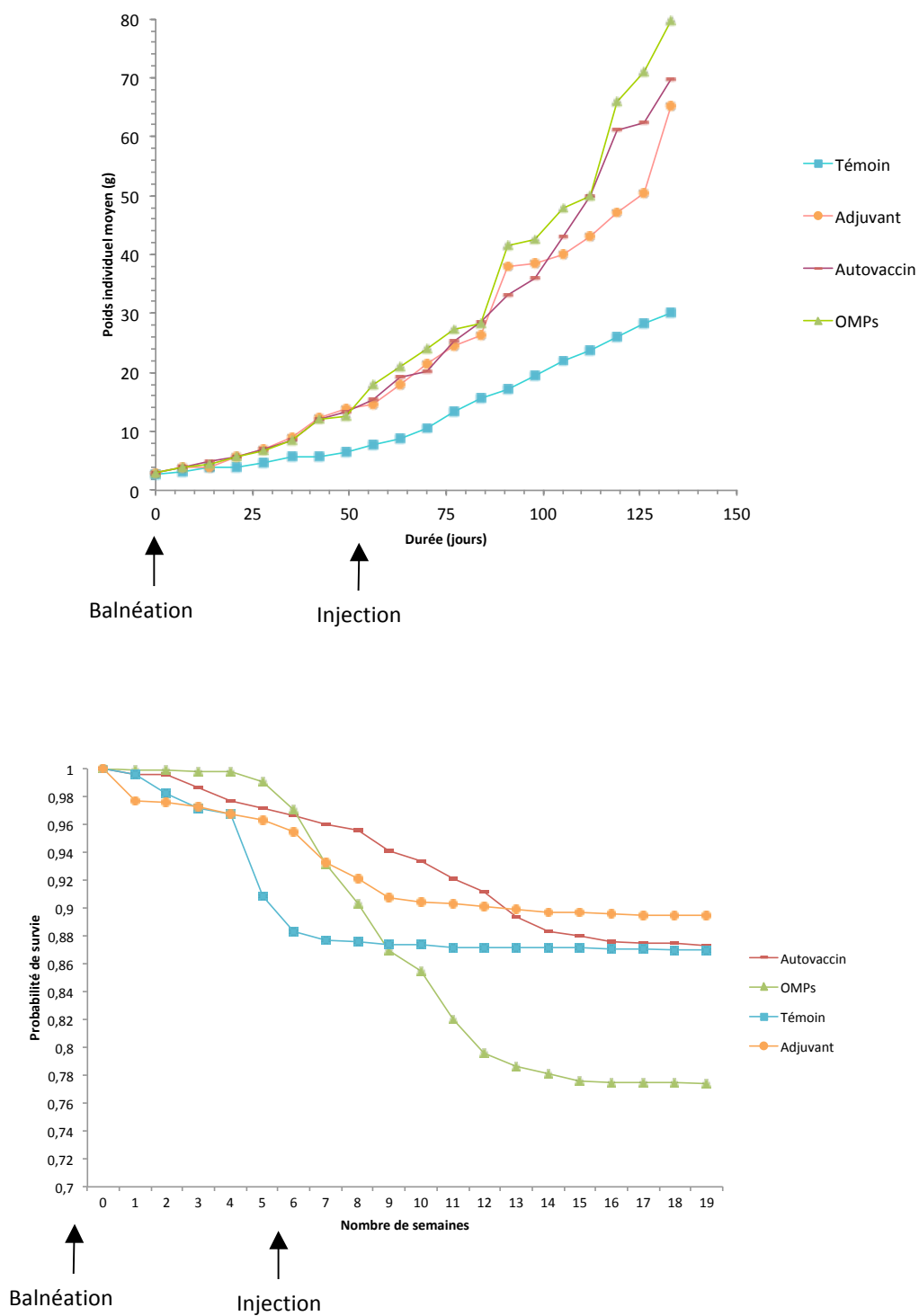


Figure 42. Enregistrement des données zootechniques de prises de poids moyen des truitelles (a) et estimation de la survie (b) dans les lots de poissons non immunisés (Témoin) ou immunisés avec de l'adjuvant, l'autovaccin ou les OMPs.

Les flèches avec balnéation et injection indiquent les périodes de vaccination.

Cette observation indique sans ambiguïté que c'est bien dans la membrane externe que sont localisés les immunogènes membranaires principaux. Elle est donc à privilégier dans la constitution des cocktails antigéniques dans la mesure où elle contient les molécules de surface. Ces dernières, en raison de leur localisation, sont à l'origine des interactions des bactéries avec le milieu extérieur et constituent donc les cibles privilégiées du système immunitaire. Des électrophorégrammes identiques ont été obtenus avec les souches de terrain de *F. psychrophilum* retenues pour préparer les cocktails vaccinaux.

b. Analyse des paramètres zootechniques

Quatre lots de truites ont été suivis sur une période de 4 mois ½ d'expérimentation. Les prises de poids et les mortalités ont été enregistrées et sont présentées dans la figure 42. Les animaux des lots Essais (« Adjuvant », « Autovaccin » et « OMPs ») présentent des prises de poids très supérieures à celle des poissons du lot « Témoin » (Poids final \approx 30,2 g). Cette différence est liée aux conditions d'élevage. En effet, la densité de poissons dans le lot « Témoin » est celle habituellement retenue pour l'éleveur en conditions de production. En revanche, les densités des lots Essais sont très faibles (approx. 0,5 individus/L) ; pour lesquelles il n'y a pas de concurrence entre les animaux vis-à-vis de l'aliment.

Il y a peu de différence dans la prise de poids des poissons immunisés par les différents cocktails, bien que les indices de croissance journaliers calculés révèlent une performance particulière pour les individus immunisés avec le cocktail « OMPs ». En effet, l'indice de croissance journalier est de 0,19 avec un poids moyen en fin d'expérience de 10 g supérieur à ceux enregistrés pour les poissons des lots « Adjuvant » et « Autovaccin » (Figure 42a et b ; Tableau XXII).

La courbe de croissance relative aux truitelles « Adjuvant » présente un léger fléchissement à partir du 110^e jour. Dans la mesure où les 3 lots de poissons recevaient la même ration alimentaire, il est plus que probable qu'en raison d'une moindre mortalité (voir paragraphe suivant), la compétition vis-à-vis de l'aliment ait été plus forte que dans les autres lots « Autovaccin » et « OMPs ».

La survie des poissons a également été suivie. Il s'agissait d'identifier et de quantifier une éventuelle protection des poissons immunisés avec les différents cocktails à l'(aux) infection(s) naturelle(s) par *F. psychrophilum*. Contre toute attente, il n'y a pas eu de crise de flavobactériose sur cette pisciculture au cours de la période de l'expérimentation. Néanmoins, des mortalités ont été enregistrées qui n'avaient pas pour cause l'agent pathogène. En effet, les prélèvements réalisés sur des poissons moribonds puis analysés par

Tableau XXII:
Évaluation des performances de croissance des poissons des différents lots.

Lots	Indice de croissance journalier (ICJ)	Poids final moyen en fin d'expérience (g)
Témoin	0,07	30,2
Adjuvant	0,16	65,2
Autovaccin	0,17	69,7
OMPs	0,19	79,6

L'indice de croissance journalier (ICJ) se calcule de la manière suivante :

$$\frac{\text{Poids final}^{\frac{1}{4}} - \text{Poids initial}^{\frac{1}{4}}}{\text{Nombre de jours}}$$

qPCR TaqMan duplex n'ont pas mis en évidence la présence de *F. psychrophilum*. L'estimation de la survie cumulées pour les poissons des différents lots ont été les suivantes : « Témoin », 87 % ; « Adjuvant », 91 % ; « Autovaccin », 87 % et enfin « OMPs », 77 %. Les données de survie collectées juste après l'immunisation par balnéation étaient particulièrement encourageantes pour les lots Essais, en particulier pour le lot « OMPs ». Néanmoins, une diminution très importante de la survie a pu être observée dans ce lot à partir du 25^e jour. A la 6^e semaine, le rappel de la vaccination par injection diminue la survie des lots « OMPs » et « Autovaccin ». En revanche, on peut noter une très nette augmentation de la survie des poissons injectés avec l'adjuvant seul. Par ailleurs, des phénomènes de mélanisation et d'inflammations sont apparus au niveau du site d'injection. Ils pourraient témoigner d'une réponse immunitaire mal maîtrisée.

Des mesures de l'expression de certains gènes de l'immunité et du stress oxydant ont été réalisées afin d'évaluer l'impact des essais de vaccination. Elles ciblaient les gènes *c3*, *igm*, *il1-β* et *mta*. Il n'a pas été possible de mettre en lien les essais de vaccination réalisés et la régulation (positive ou négative) de l'expression des gènes ciblés. Comme pour le chapitre précédent, cette partie du travail devra être revisitée en raison du nombre insuffisant d'échantillons collectés. En effet, des essais de mise au point ont été nécessaires pour affiner la nature des sondes moléculaires (= séquences des amorces) et les conditions d'utilisation, en particulier la sélection de gènes dits « de ménage » permettant l'étalonnage de l'expression des gènes étudiés et les conditions de la RT-PCR. Ces premiers tâtonnements, qui ont utilisé une quantité non-négligeable d'échantillons, ne seront plus nécessaires dans la mesure la méthode d'analyse est bien normalisée maintenant.

4 Conclusion

La préparation « Autovaccin » est intéressante dans la mesure où elle bien maîtrisée par la filière. Des cabinets vétérinaires possèdent les connaissances et les équipements permettant de répondre rapidement à des prescriptions vétérinaires. Ces autovaccins sont préparés à partir d'une ou plusieurs souche(s) d'un agent pathogène opérant sur un site géographique ; les micro-organismes cultivés *in vitro* sont ensuite lysés et constituent la partie « antigénique » du cocktail vaccinant après mélange avec de l'adjuvant. L'inconvénient d'une telle préparation relativement peu élaborée réside dans le nombre important de motifs antigéniques susceptibles d'initier une réponse immunitaire ; certains motifs induiront une réponse protectrice alors que de nombreux autres sont inutiles pour la protection. De ce fait, le titre en anticorps « efficaces » peut se révéler assez faible. Dans la

mesure où les protéines de surface des agents pathogènes représentent souvent des facteurs de virulence importants et sont impliqués dans les réponses immuno-protectrices des hôtes infectés, il était cohérent de proposer une démarche de vaccination fondée sur l'utilisation d'inocula fractionnés car enrichis avec de telles molécules. C'est pourquoi, nous avons mis en œuvre un protocole de préparation l'une fraction enrichie en membranes externes, éprouvé sur la souche type *F. psychrophilum* JIP 02/86 (Dumetz et coll., 2008), à partir des souches fraîchement isolées du terrain. Il s'agissait donc d'inclure dans un cocktail vaccinant, les protéines de surface de souches de *F. psychrophilum*, représentatives de la diversité antigénique du terrain. L'analyse des sérums de truites survivantes à une crise de flavobactériose a montré que les protéines de la membrane externe sont bien celles qui induisent la synthèse d'anticorps. Il reste à démontrer que les anticorps produits sont protecteurs à travers leur capacité à neutraliser *F. psychrophilum*.

Peu d'enseignements doivent être retirés de cette première tentative de vaccination. En effet, aucune crise de flavobactériose « naturelle » n'a permis d'éprouver les lots vaccinés afin de pouvoir objectiver la protection potentielle des cocktails vis-à-vis de *F. psychrophilum*. Tout au plus, il est possible d'indiquer la relative innocuité des préparations inoculées aux poissons par balnéation. Alors que la préparation vaccinale « Adjuvant » administrée par injection n'induit pas de mortalité excessive, il n'en est pas de même pour les inocula « Autovaccin » et « OMPs ». A ce stade du travail, on ne peut pas exclure la présence de traces d'autres composés antigéniques dans les préparations bactériennes (lipopolysaccharides, muramyl dipeptide, ...) qui se surajoutent à l'adjuvant SEPPIC utilisé pour élaborer ces préparations. La présence au point d'injection de signes inflammatoires importants chez certains poissons témoigne d'une réaction immunitaire mal contrôlée.

Les résultats sur l'impact positif des préparations vaccinales sur la prise de poids des truitelles sont un peu en trompe l'œil. En effet, les lots de poissons vaccinés présentaient une densité de population très faible par rapport aux densités habituelles en itinéraire de production classique. Là encore, ces données devront être réévaluées en conditions de vaccination plus proches de la réalité.

Malgré les importantes avancées réalisées au cours des dernières années par rapport aux différents aspects de la vaccination contre *F. psychrophilum* (Plant et coll., 2014), de nouvelles stratégies et initiatives sont nécessaires pour développer un vaccin commercialisable. Beaucoup d'études utilisant des truites arc-en-ciel convalescentes ont montré l'importance des propriétés antigéniques de certaines protéines comme OmpH, OmpA et FspA, de *F. psychrophilum*, qui sont des candidates intéressantes pour la

vaccination (Dumetz et coll., 2007 ; Crump et coll., 2005). L'inactivation des cellules de *F. psychrophilum* a été également testée comme vaccins en laboratoire par injection intrapéritonéal et immersion (LaFrentz et coll., 2011). De même, l'utilisation de souches atténuées et sauvages pour immuniser les poissons montre que les préparations offrent de hauts niveaux de protection. Néanmoins, leur application se heurte avec les règlements pour la protection de l'environnement dans beaucoup de pays (Alvarez et coll., 2008 ; Fredericksen et coll., 2013).

CHAPITRE VII

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'objectif général de ces travaux de thèse était de chercher à mettre en avant une logique de gestion intégrée pour la prévention de la flavobactériose du reproducteur jusqu'au produit commercialisable, afin de limiter les risques de contamination et de gestion collective en associant différents sites d'une même chaîne d'élevage.

C'est dans ce contexte, que nous avons étudié la bactérie pathogène de poissons *F. psychrophilum*, sur le territoire français. Cette bactérie fait partie des principaux agents pathogènes répertoriés responsables des cas déclarés de pertes dans les élevages de salmonidés (Guichard 2004). Nous nous sommes focalisés sur une approche multiple : (i) la mise en place d'un outil moléculaire rapide d'identification de l'agent pathogène ; la validation sur site de production de (ii) l'efficacité d'outils prophylactiques comme la désinfection des œufs, (iii) l'installation d'une flore de compétition et enfin (iv) l'élaboration d'un vaccin. Des avancées dans ces approches préventives sont essentielles afin de proposer aux pisciculteurs des approches alternatives à la seule approche curative vraiment efficace, l'antibiothérapie.

1. L'identification préventive de l'infection à *F. psychrophilum* des œufs/alevins par une approche moléculaire (qPCR)

Nos recherches se sont orientées dans un premier temps sur le diagnostic de la flavobactériose qui pouvait être réalisé par observation des signes de la maladie et par des approches moléculaires de type PCR afin de détecter directement un fragment du génome de *F. psychrophilum* à partir d'échantillons de poissons. Ces méthodes moléculaires permettent la pose d'un diagnostic d'infection au mieux 24 à 48 h après le prélèvement d'animaux contaminés. Historiquement, deux approches qPCR avaient été proposées afin de quantifier l'agent pathogène dans les échantillons de poissons : (i) la première « semi-quantitative » amplifie un long fragment d'*adnr16S* de 972 pb mais exige une analyse de l'amplifiat en gel d'agarose pour confirmer la spécificité (DelCerro et coll., 2002a) ; la seconde amplifie un court fragment d'*adnr16S* de 147 pb mais dont la spécificité peut être mise à mal (Orieux et coll., 2011). Aucune des deux ne permet de déterminer directement un taux d'infection dans les organes du poisson ; ce taux n'est obtenu qu'avec la pesée toujours aléatoire des organes. Les résultats obtenus dans le 1^{er} volet de ce travail ont permis de proposer une méthode d'identification/quantification moléculaire de *F. psychrophilum* qui donne un résultat en moins de trois heures et qui pourrait devenir la méthode de référence pour évaluer un taux d'infection sur une matrice de l'hôte, la truite arc-en-ciel. Tout d'abord, il a été nécessaire d'optimiser le test de détection par qPCR en

duplex qui se réalise en deux étapes simultanées : l'amplification du marqueur *adnr 16S* d'un côté et l'amplification du marqueur β -actine de l'autre. Aussi, nous avons cherché à optimiser les deux amplifications afin d'obtenir une sensibilité maximale des deux marqueurs sans nuire à la spécificité. Dans une qPCR en duplex, les deux réactions chimiques d'amplification se réalisent de façon simultanée. Une compétition entre les deux amplifications peut donc s'installer vis-à-vis des substrats et de l'enzyme présents dans le mélange réactionnel. Pour en limiter les effets, il est possible d'agir sur plusieurs leviers : le choix des amorces, bien sûr, mais également les concentrations respectives en amorces, la température d'hybridation, le choix du réactif enzymatique et, dans une moindre mesure, des ajustements de concentrations pour certains composants du cocktail réactionnel (les dNTPs, le magnésium, la force ionique, ...). Ce travail a permis le développement d'un test de détection précoce de *F. psychrophilum* chez la truite-arc-en ciel. Alors que les méthodes qPCR proposées précédemment estiment une charge bactérienne sur un échantillon biologique de poisson, notre test permet la détermination d'un taux d'infection en une seule analyse. Par ailleurs, les seuils de détection et de quantification absolues évalués à 32 et 4 bactéries par réaction, respectivement, soulignent une sensibilité du test cohérente avec celles décrites en utilisant d'autres approches moléculaires (Del Cerro et coll., 2002b ; Orioux et coll., 2011 ; Marancik et Wiens, 2013 ; Strepparava et coll., 2014).

Des campagnes de prélèvements d'échantillons ont été organisées sur plusieurs sites piscicoles avec pour objectif principal d'isoler des souches de *F. psychrophilum* caractéristiques aux sites. A partir d'un jeu de 195 colonies isolées de poissons malades, seules 55 souches avaient pu être initialement certifiées *F. psychrophilum* à l'aide du test qPCR décrit par Del Cerro. Le profilage génétique réalisé par PFGE a permis de répartir ces souches en cinq groupes : I, II, IIIa, IIIb et IV. Le test qPCR TaqMan développé au cours de ce travail de thèse indique bien l'appartenance des isolats des groupes II, IIIa et IIIb à l'espèce *F. psychrophilum* mais écarte les souches du groupe IV, deux isolats collectés dans deux fermes distinctes d'esturgeons, ainsi que deux des trois souches du groupe I. Des analyses complémentaires de ces isolats par MALDI-TOF ou d'homologies de séquences *adnr16S* confirment qu'ils appartiennent à des genres ou espèces distinctes de *F. psychrophilum*. Néanmoins, l'identification de la souche MLEK14 reste ambiguë. En effet, les analyses MALDI-TOF et BLAST indiquent qu'il s'agit d'une souche appartenant soit à l'espèce *F. frigidarium*, soit à *F. frigoris*, alors qu'elle a été clairement identifiée *F. psychrophilum* par le test qPCR « Del Cerro » et qu'elle obtient avec notre test qPCR un score de spécificité *F. psychrophilum* faible (< 0,6) mais du même ordre de grandeur que celui enregistré pour la

souche *F. psychrophilum* NCIMB47. Des investigations complémentaires sont nécessaires pour clarifier ce point. En particulier, il est probablement nécessaire de cloner puis de séquencer les copies du gène d'*adnr165* de cette souche afin de pouvoir analyser leur éventuelle diversité.

Par ailleurs, l'analyse des échantillons collectés au cours des campagnes de prélèvement de truites d'élevage par notre test qPCR a révélé une prévalence d'infection à *F. psychrophilum* relativement faible (2 jusqu'à 7 %) malgré l'apparition de nombreuses crises de flavobactériose. Très probablement, l'agent pathogène est présent à un taux résiduel d'infection inférieur au seuil limite de détection (4 bactéries). Cette observation est cohérente avec les études de détection/quantification de *F. psychrophilum* antérieures par qPCR (Orieux et coll., 2011 ; Marancik et Wiens, 2013 ; Strepparava et coll., 2014). Il est donc très probable que la plupart des truites d'élevage soient porteuses asymptomatiques de *F. psychrophilum*. L'agent pathogène semble capable de coloniser sans dommage certains organes dont la rate de l'hôte. A la faveur de conditions environnementales favorables qu'il reste à bien identifier ou d'une moindre efficacité du système immunitaire, lors d'une co-infection par exemple, *F. psychrophilum* peut opportunément se multiplier pour diffuser dans l'organisme hôte puis se propager dans la population entière de l'élevage.

2. La mise en place de procédures de désinfection efficaces au stade œuf

Afin de limiter l'entrée et la propagation des agents pathogènes dans les élevages, les pisciculteurs mettent en œuvre un plan de contrôle sanitaire. En particulier, les œufs introduits dans les écloséries sont systématiquement désinfectés par des traitements avec des biocides autorisés. Cette première étape de désinfection, ainsi que celles régulièrement réalisées sur les alevins et les jeunes truitelles, est nécessaire mais malheureusement pas suffisante pour maintenir un statut sanitaire correct aux poissons. Par ailleurs, les conditions d'application de certains biocides préconisées par la profession datent de plusieurs années et n'ont pas été définies spécifiquement pour prévenir les crises de flavobactériose. C'est dans ce cadre que les travaux consignés dans le Chapitre IV ont cherché à objectiver l'efficacité de cinq désinfectants vis-à-vis de *F. psychrophilum* appliqués sur les œufs de truite arc-en-ciel.

Dans un premier temps, les cinq biocides sélectionnés (Bronopol, Peroxyde d'hydrogène, Glutaraldéhyde, Incimaxx Aquatic® et Chloramine-T) ont été testés pour leur capacité à inhiber la croissance de la souche-type (JIP02/86) et d'autres souches de *F. psychrophilum* fraîchement isolées de sites piscicoles. Les cinq désinfectants sont clairement

bactériostatiques. De légères différences de sensibilités aux biocides sont enregistrées avec les différentes souches de *F. psychrophilum* suggérant de possibles différences d'état physiologiques des suspensions bactériennes utilisées pour l'ensemencement des cultures.

Le test de viabilité EMA-qPCR a été utilisé ensuite pour évaluer la capacité des biocides sélectionnés à tuer *F. psychrophilum*. Les valeurs du facteur D sont déterminées pour chacune des concentrations testées afin de pouvoir calculer le facteur Z du biocide donné. Ces facteurs D et Z ont été déterminés pour les cinq molécules. Pour chaque biocide, des conditions bactéricides vis-à-vis de *F. psychrophilum* ont été proposées sous la forme de couples de correspondance [Concentration/Durée d'application] qui permettent d'éliminer 90 % d'une population initiale de *F. psychrophilum*.

L'innocuité des conditions de désinfection proposées a été vérifiée sur des œufs de truite arc-en-ciel. Il s'agissait d'évaluer l'impact du traitement biocide (5 désinfectants; 3 concentrations ; 20 minutes d'exposition) sur la capacité des œufs à éclore et à permettre le développement ultérieur des alevins. La viabilité des œufs ainsi que le développement des alevins ne sont pas impactés significativement par des traitements désinfectants qui mettent en œuvre quatre des cinq biocides évalués. Aucune augmentation significative de la mortalité n'a pu être enregistrée avec les différents lots d'œufs traités avec le bronopol, le peroxyde d'hydrogène, l'Incimaxx Aquatic® ou la chloramine-T aux concentrations testées. Des valeurs de pourcentage relatif de survie (= RPS) positives en présence de bronopol ou de peroxyde d'hydrogène soulignent l'effet protecteur de ces biocides par rapport aux lots témoins non-traités et qui limitent le développement des agents pathogènes initialement présents à la surface des œufs. En revanche, des valeurs de RPS négatives ont également été enregistrées avec les œufs traités avec l'Incimaxx Aquatic®. Cette observation suggère de possibles effets secondaires négatifs, concentration-dépendants, sur la viabilité des œufs. De même, une valeur négative RPS est obtenue en présence de chloramine-T 50 ppm, alors que des valeurs positives sont observées pour des concentrations bien supérieures soulignant le bénéfice du traitement de désinfection. Il est en effet possible qu'une étape de désinfection de 20 minutes avec la chloramine-T 50 ppm ne soit pas suffisante pour être réellement efficace.

Nous avons donc bien développé au cours de cette étude, une nouvelle trousse à outils « Désinfection » spécifiquement dédiée à la lutte contre *F. psychrophilum* que va pouvoir s'approprier la filière piscicole et qui devrait participer à la réduction de la présence de l'agent pathogène sur les sites piscicoles. D'autres alternatives intéressantes aux biocides existent comme les huiles essentielles pour traiter les poissons. En effet, ces huiles

présentent des propriétés antibactériennes, antivirales, antifongiques ou insecticides (Consentino et coll., 1999 ; Ultee et coll., 2002). Elles sont extraites à partir de différents organes de plantes comme des fleurs, des graines, des feuilles, des écorces, des herbes, des fruits et des racines (Bakkali et coll., 2008). En aquaculture, elles ont été étudiées comme agent de préservation des fruits de mer (Lin et coll., 2004 ; Kostaki et coll., 2009 ; Pyrgotou et coll., 2010) ou, *in vivo*, comme agent antibactériens pour limiter les infections bactériennes comme par exemple à *Vibrio* chez la crevette (*Vibrio alginolyticus*/*Litopenaeus vannamei* ; Yeh et coll., 2009 ; Randrianarivelo et coll., 2010). Dans le même registre, il a été montré qu'une supplémentation dans l'alimentation de truites arc-en ciel avec des huiles essentielles de thym ne modifie pas en profondeur la composition du microbiote intestinal. En revanche, les huiles testées *in vitro* sont capables d'inhiber la croissance d'un certain nombre d'agents pathogènes de poissons dont *F. psychrophilum* (Navarrete et coll., 2010). Il est vrai que les CMI sont observées à des concentrations en huiles essentielles très supérieures (320 mg/L) à celle retenue pour l'étude *in vivo* (20 mg/kg d'aliment). La sensibilité de *F. psychrophilum* aux huiles essentielles a été confirmée lors de tests *in vitro* avec de l'huile de romarin (Ostrand et coll., 2012). Néanmoins, il reste à trouver la place de ces approches novatrices et prometteuses dans une stratégie globale de management sanitaire des poissons d'élevage.

3. L'utilisation d'un traitement probiotique limitant l'installation d'agents pathogènes (dont *F. psychrophilum*).

Les traitements efficaces de désinfection participent à la création de terrains microbiologiquement « vierges » et qui sont donc propices à la colonisation par différents micro-organismes présents dans l'environnement, potentiellement des bactéries pathogènes dont *F. psychrophilum*. Aussi, il semble souhaitable d'insérer, à la suite du traitement de désinfection efficace, une étape d'incubation des œufs en présence de microorganismes potentiellement probiotique et dont l'effet compétiteur, entre autres, devrait limiter les risques d'installation de bactéries indésirables.

Dans le cadre de ce travail, nous avons délibérément choisi des cocktails probiotiques commercialisés (Bactocell® ou E112®) qui garantissaient une certaine innocuité vis-à-vis des animaux traités. Il s'agissait de s'assurer que les pisciculteurs qui ont accepté des expérimentations sur les sites piscicoles de production ne puissent pas être inquiétés. Les deux flores ont bien été retrouvées sur les animaux traités sans modifier significativement les performances zootechniques enregistrées. D'un point de vue sanitaire, les résultats

collectés sont assez contrastés, se limitant à réduire le nombre et/ou l'intensité des crises de flavobactériose. Bien que les micro-organismes qui constituent les cocktails testés soient connus pour avoir des propriétés immunostimulantes, aucune différence significative dans l'expression de certains gènes de l'immunité ciblés n'a été enregistrée. Il reste qu'un nombre d'échantillons analysés est très insuffisant pour exclure définitivement des interactions plus étroites entre la flore utilisée et l'hôte traité.

Le choix initial de cocktails bactériens « prêts à l'emploi » doit probablement être reconsidéré afin de rechercher des souches microbiennes plus adaptées à l'environnement de l'hôte ciblé, la truite arc-en-ciel. C'est ainsi, que *Pseudomonas* M174 a été isolée d'œuf de truite arc-en-ciel puis apportée *via* l'alimentation ou par balnéation à des alevins (8-9 g). Il s'agit d'une souche bactérienne intéressante puisqu'il a été montré qu'elle s'installe durablement chez le poisson, stimule son immunité innée et qu'elle est capable de produire des sidérophores permettant d'inhiber la croissance de *F. psychrophilum* (Korkea et coll., 2011 ; Storm-Bestor et Wiklund 2011). Des potentialités identiques ont été enregistrées avec la souche M162 de *Pseudomonas* (Korkea et coll., 2012). Dans le même ordre d'idée, sept bactéries ont été isolées à partir du microbiote cutané d'omble de fontaine et présentent des activités antagonistes vis-à-vis de *F. columnare* et *F. psychrophilum*. L'une d'entre elles, identifiée comme une espèce de *Rhodococcus*, a été testée avec succès *in vivo* pour son impact positif sur la survie des poissons. Paradoxalement, cette bactérie n'est retrouvée ni dans le mucus des animaux traités ni dans l'eau mais est détectée dans le biofilm des bassins. Cette présence dans l'environnement proche des poissons semble contribuer à limiter la pression des agents pathogènes et donc indirectement à participer à améliorer la survie des poissons (Boutin et coll., 2013). Des candidats bactériens probiotiques ont été isolés à partir du tractus gastro-intestinal de truites arc-en-ciel et testés pour leur activité antagoniste vis-à-vis de *F. psychrophilum*. Au total, seize isolats bactériens ont montré des capacités à contrôler ou à réduire les épisodes de flavobactériose (Burbank et coll., 2012). En particulier, la souche, *Enterobacter* sp. C6-6 isolée du tractus gastro-intestinal de la truite arc-en-ciel semble très prometteuse : elle inhibe *in vitro* la croissance de *F. psychrophilum* et la mortalité des truites arc-en-ciel nourries avec de l'aliment supplémenté avec cette souche est significativement réduite par rapport à celle enregistrée chez les truites témoins (Burbank et coll., 2011). Il s'agit de résultats encourageants qui ouvrent des perspectives intéressantes dans la recherche et la caractérisation de nouvelles souches bactériennes antagonistes de *F. psychrophilum* mais issues de la truite arc-en-ciel.

4. L'administration d'un cocktail vaccinant protecteur

L'approche préventive pour lutter contre les flavobactérioses par le biais de vaccin est intéressante mais difficile car il s'agit de préparer et d'administrer un cocktail antigénique susceptible d'induire une réponse protectrice sur des jeunes animaux dont le système immunitaire est en cours de maturation. En effet, les infections à *F. psychrophilum* (= RTFS) sont particulièrement dévastatrices sur les truites arc-en-ciel au stade « alevin » (5-50 g). De manière très pragmatique, nous avons choisi de préparer des cocktails vaccinaux classiques constitués pour la partie « adjuvant », d'huiles ou de nanoparticules utilisées par la filière piscicole dans l'élaboration d'autres vaccins et, pour la partie antigénique, d'une suspension bactérienne inactivée ou d'une suspension enrichie en membranes externes. Plusieurs souches de *F. psychrophilum* fraîchement isolées des sites aquitains ont été utilisées pour tenir compte de l'éventuelle diversité antigénique.

Au cours de ce travail, nous avons vérifié que c'est bien dans la membrane externe que se trouvent les immunogènes majeurs qui, en raison de leur localisation en surface, sont susceptibles d'induire la synthèse d'anticorps protecteurs. Malheureusement, la protection induite par les cocktails préparés n'a pas pu être éprouvée en raison de l'absence d'épisodes infectieux à *F. psychrophilum* naturels. Tout au plus, nous avons montré que la vaccination par injection de « membrane externe » en présence d'adjuvant est à l'origine de l'apparition de nécroses importantes chez le poisson. Elle semble également peu adaptée pour une immunisation en masse à l'échelle industrielle car coûteuse et stressante pour les poissons.

Les futurs travaux sur la vaccination contre la flavobactériose devront prendre en compte la dimension environnementale et s'orienter vers des procédures de vaccination par balnéation et/ou par ingestion orale plus compatibles avec les contraintes de l'aquaculture. La vaccination par voie orale dans laquelle le cocktail vaccinant peut être inclus dans l'alimentation est à privilégier dans la mesure où les poissons sont des animaux de rente dont la valeur économique individuelle reste très faible. Des premiers essais ont consistés à incorporer le cocktail vaccinant dans des nanoparticules sphériques qui protègent l'antigène des agressions du milieu aquatique et du tractus digestif. Après consommation, les antigènes peuvent rejoindre la circulation après pinocytose par l'épithélium du tube digestif (Yoshikawa et coll., 2008). L'efficacité de cette approche vaccinale reste à être démontrée chez la truite arc-en-ciel.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abid A., Davies SJ., Waines P., Emery M., Castex M., Gioacchini G., Carnevali O., Bickerdike R., Romero J., Merrifield DL. (2013). Dietary synbiotic application modulates Atlantic salmon (*Salmo salar*) intestinal microbial communities and intestinal immunity. *Fish and Shellfish Immunology* : 1948-56.
- Abós B., Pignatelli J., Luque A., González L., Tafalla C. (2013). "Transcriptional heterogeneity of IgM+ cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues." *PLoS One* 8(12).
- AFPPE (2012). "Association française des professionnels de la pisciculture d'étang."
- Agreste (2011). Recensement 2008 de la salmoniculture et de la pisciculture marine et des élevages d'esturgeons + Esturgeons et caviar : une filière dynamique, l'esturgeon. Les dossiers 11, 87-91.
- Akhter N., Wu B., Memon AM., Moshin M (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture : A review. *Fish and Shellfish Immunology* 45 733-741.
- Altinok I(2011). Multiplex PCR assay for detection of four major bacterial pathogens causing rainbow trout disease. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2011 Feb 22;93(3):199-206. doi: 10.3354/dao02300.
- Altschul S., Gish W., Miller W., Myers EW., Lipman DJ. (1990). "Basic local alignment search tool." *Journal of Molecular Biology*. 215(3): 403-410.
- Alvarez B., Prieto M., McBride MJ., Guijarro, JA. (2006). A mutation in *Flavobacterium psychrophilum* tlpB inhibits gliding motility and induces biofilm formation. *Applied and environmental microbiology* 72(6): 4044-4053.
- Alvarez B., Menendez A., Guijarro JA. (2008). A mutant in one of two exbD loci of a TonB system in *Flavobacterium psychrophilum* shows attenuated virulence and confers protection against cold water disease. *Microbiology* 154(Pt 4): 1144-1151.
- Amara, U., D. Rittirsch, M. Flierl, U. Bruckner, A. Klos, F. Gebhard, J.D. Lambris et M. Huber-Lang. 2008. «Interaction Between the Coagulation and Complement System». Dans *Current Topics in Complement II*, Trad. English, sous la dir. de J.D. Lambris, p. 68-76. Coll. «Advances in Experimental Medicine and Biology», no 632: Springer US.
- Amita K., Honma T., Wakabayashi H (2000). An investigation on the distribution of *Flavobacterium psychrophilum* in the Umikawa River. *Fish Pathology* 35(4): 193-197.
- Andersson E., Tormanen V., Matsunaga T (1995). Evolution of the immunoglobulin M constant region genes of salmonid fish, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): implications concerning divergence time of species. *Immunogenetics* 41(5): 312-315.
- Angulo F.J. (2000) Antimicrobial agents in aquaculture: potential impact on health. *APUA Newsletter* 18: 1–6.
- ANSES, agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail 2012. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2012. Rapport annuel.
- Apablaza P, Brevik OJ, Mjos S, Valbenito S, Ilardi P, Battaglia J, Dalsgaard I and Nylund A (2015). Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) analysis of *Flavobacterium psychrophilum* from salmonids in Chile and Norway. *BMC Veterinary Research* 11: 150 DOI 10.1186/s12917-015-0469-7.
- Araújo C, Muñoz-Atienza E, Hernández PE, Herranz C, Cintas LM, Igrejas G, Poeta P (2015). Evaluation of *Enterococcus spp.* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), feed, and rearing environment against fish pathogens. *Foodborne pathogens and disease*; 12(4):311-22. doi: 10.1089/fpd.2014.1906.

- Austin B. (1992). The recovery of *Cytophaga psychrophila* from two cases of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) fry syndrome in the U.K. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 12, 207-208.
- Avendano-Herrera R., Magarinos B., Irgang R. and Toranzo A.E. (2006) Use of hydrogen peroxide against the fish pathogen *Tenacibaculum Maritimum* and its effect on infected turbot (*Scophthalmus Maximus*). Aquaculture 257, 104-110.
- Avendano-Herrera R, Araya P, Fernandez J (2009). Molecular analysis of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from salmonid farms in Chile. Bulletin Eur Assn Fish Pathology P.29, 184-192.
- Avendaño-Herrera R, Houel A, Irgang R, Bernardet JF, Godoy M, Nicolas P, Duchaud E(2014). Introduction, expansion and coexistence of epidemic *Flavobacterium psychrophilum* lineages in Chilean fish farms. Vet Microbiol. 2014 Jun 4;170(3-4):298-306. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.02.009. Epub 2014 Feb 16.
- B**
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008): Biological effects of essential oils a review. In: Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 46 (2), pp. 446-75.
- Balcázar J., De Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Vendrell D., Calvo AC., Márquez I., Gironés O., Muzquiz JL. (2007a). Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). British Journal of Nutrition 97: 522-527.
- Balcázar J., Daniel de Blas., Ruiz-Zarzuela I., Gironés I., Múzquiz O, Balcazar JL. (2007b). In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. Veterinary microbiology 122(3-4): 373-380.
- Baliarda A., Faure D., Urdaci M. C. (2002). Development and application of a nested PCR to monitor brood stock salmonid ovarian fluid and spleen for detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Journal of applied microbiology 92(3): 510-516.
- Bandyopadhyay P and Das Mohapatra (2008). Effect of a probiotic bacterium *Bacillus circulans* PB7 in the formulated diets: on growth, nutritional quality and immunity of Catla catla (Ham.). Fish physiology and biochemistry 35((3)): 467-478.
- Barbier P, Houel A, Loux V, Poulain J, Bernardet J-F, Touchon M, and Duchaud E. (2012) "Complete genome sequence of *Flavobacterium indicum* GPSTA100-9T, isolated from warm spring water," Journal of Bacteriology, vol. 194, no. 11, pp. 3024–5.
- Barnes ME. and Brown ML. (2011) A review of *Flavobacterium psychrophilum* biology, clinical signs, and bacterial cold water disease prevention and treatment. Open Fish Science J 4, 40-48.
- Barreau G., Tompkins TA., De Carvalho VG. (2012). Draft genome sequence of probiotic strain *Pediococcus acidilactici* MA18/5M. Journal of Bacteriology.;194(4):901. doi: 10.1128/JB.06563-11.
- Baudin-Laurencin F., Castric JC., Vigneulle M., Tixerant G. (1989). La myxobactériose viscérale de la truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri* R: une forme nouvelle de la maladie de l'eau froide à *Cytophaga psychrophila*. Bulletin Académie Vétérinaire de France 62: 147-157.
- Behnke RJ. (1966). Relationships of the Far Eastern Trout, *Salmo mykiss* walbaum Copeia. 1966(2): 346-348.

- Bernardeau M., Guguen M., Vernou, JP. (2006). Beneficial *lactobacilli* in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 487-513.
- Bernardet J.F., Baudin-Laurencin F., Tixerant G. (1988). First identification of *Cytophaga psychrophila* in France. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 8(5): 104-105.
- Bernardet JF and Kerouault B (1989). Phenotypic and genomic studies of *Cytophaga psychrophila* isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 1796-1800.
- Bernardet JF., Segers P., Vancanneyt M., Berthe F., Kersters K., Vandamme P. (1996). Cutting a gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* strohl and tait 1978). *International. Journal of. Systmatic. Bacteriology*. 46: 128-148.
- Bernardet JF., Nakagawa Y., Holmes B. (2002). Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *International. Journal. Systematic. Evolution. Microbiology*. 52 : 1049-1070.
- Bernardet JF and Nakagawa Y. (2003). An introduction to the family *Flavobacteriaceae*. in *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Edn. 3, rel. 3.15.
- Bishop SC, AxfordRFE, Nicholas FW, Owen JB (2010). *Breeding for disease resistance in farm animals.*, Ed. 3. CABI; Wallingford; UK.
- Birkbeck TH., Reid HI., Darde B and Grant AN. (2005) Activity of bronopol (Pyceze®) against bacteria cultured from eggs of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* and cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* 254, 125-128.
- Blackburn CW and McCarthy JD. (2000). Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 55 : 285–290
- Blondiaux N., Gaillot O., Courcol RJ. (2011). Identification bactérienne de routine par spectrométrie de masse MALDI-TOF au CHU de Lille : impact médical et économique. *Les cahiers de la Référence ANSES* 5.
- Bols, N.C., J.L. Brubacher, R.C. Ganassin et L.E.J. Lee. 2001. «Ecotoxicology and innate immunity in fish». *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 25, no 8-9, p. 853-873.
- Borg AF. (1960). Studies on *myxobacteria* associated with diseases in salmonid fishes. *American Association for the advancement of science, Wildlife Disease*, N° 8, Washington, DC.
- Boutin S., Audet C and Derome N. (2013) Probiotic treatment by indigenous bacteria decreases mortality without disturbing the natural microbiota of *Salvelinus fontinalis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 59 : 662-670.
- Boutin S, Sauvage C, Bernatchez L, Audet C, Derome N (2014). Inter Individual Variations of the Fish Skin Microbiota: Host Genetics Basis of Mutualism? *PLoS ONE* 9(7): e102649. doi:10.1371/journal.pone.0102649.
- Bowden TJ., Bricknell IR. 2013. Management of finfish and shellfish larval health in aquaculture hatcheries. In: *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. Eds; Allen & Burnell, Woodhead Publishing, Cambridge, UK.
- Bowker JD., Carty D., Smith CE., Bergen SR. (2011). Chloramine-T margin-of-safety estimates for fry, fingerling, and juvenile rainbow trout. *North American Journal of Aquaculture* 73: 259-269.

- Branson E. (1996). Rainbow trout fry syndrome. *Fish Veterinary Journal* 1, 1-7.
- Breton (2005). La truite et son élevage. *Aquaculture-pisciculture*. Ed. Lavoisier Tec & Doc.
- Brown L., Cox WT., Levine RP. (1997). Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Diseases of Aquatic Organisms* 29(3): 213-218.
- Bruno, DW. (1992). *Cytophaga psychrophila* (= *Flexibacter psychrophilus*) (Borg), histopathology associated with mortalities among farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in the UK. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 12: 215-216.
- Bustos PA., Calbuyahue J., Montana J., Opaz, B., Entrala P., Solerisenc R. (1995). First isolation of *Flexibacter psychrophilus*, as causative agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS), producing rainbow trout mortality in Chile. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 15: 162-164.
- Burbank DR, Lapatra SE, Fornshell G, Cain KD (2012). Isolation of bacterial probiotic candidates from the gastrointestinal tract of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and screening for inhibitory activity against *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases* (Impact Factor: 1.51). 08/2012; 35(11):809-16. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2012.01432.x
- Burridge L., Weis JS., Cabello F., Pizarro J., Bostick K. (2010). Chemical use in salmon aquaculture : A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture* 306: 7-23.
- C**
- Cabello F. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8 (7), 1137–1144.
- Carnevali O., De Vivo L., Sulpizio R., Giocchini G., Olivotto L., Silvi S and Cresci A. (2006). Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.) with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* 258: 430-438.
- Castex M., Chim L., Pham D., Lemaire P., Wabete N., Nicolas JL., Schmidely P., Mariojouis C. (2008). Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture* 275, 182–193
- Castillo A., Lopez-Fierro P., Alvarez F., Zapata A., Villena AJ. (1990). Enzyme- and immuno-histochemical study of the thymic stroma in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson. *Thymus* 15(3): 153-166.
- Castillo A., Sanchez C., Dominguez J., Kaattari SL., Villena AJ. (1993). Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunology*. 17(5): 419-424.
- Castillo D., Higuera G., Villa M., Middelboe M., Dalsgaard I., Madsen L., Espejo RT. (2012). Diversity of *Flavobacterium psychrophilum* and the potential use of its phages for protection against bacterial cold water disease in salmonids. *Journal of fish diseases* 35(3): 193-201.
- Cepeda C. and Santos Y. (2000). Rapid and low-level toxic PCR-based method for routine identification of *Flavobacterium psychrophilum*. *International Microbiology* 3, 235-238.
- Cepeda C., Garcia-Marquez S., Santos Y. (2004). Improved growth of *Flavobacterium psychrophilum* using a new culture medium. *Aquaculture* 238(1-4): 75-82.
- Chen YC, Davis MA, LaPatra SE, Cain KD, Snekvik KR, Call DR (2008). Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* recovered from commercially raised rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and spawning coho salmon, *O. kisutch* (Walbaum). *Journal of fish disease* 31, 765-773.

- Chevassus B., Chourrout D., Quillet E (1983). Production of viable hybrids in salmonids by triploidization. *Genetics selection evolution* 15(4): 519-532.
- Christensen J., Wong G, Kaattari SL. (1992). Effectiveness of an oral enteric coated *vibrio* vaccine for use in salmonid fish. *Immunology Investigation* 21, 353-364.
- Cipriano RC. (2005). Intraovum infection caused by *Flavobacterium psychrophilum* among eggs from captive Atlantic salmon broodfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 17(3): 275-283.
- Consentino S, Tuberoso CI, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F. (1999): In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. In: *Letters in applied microbiology*. 29 (2), p. 130-5.
- Crump EM., Perry MB., Clouthier SC., Kay WW. (2001). Antigenic characterization of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and Environmental Microbiology* 67(2): 750-759.
- Crump EM., Burian J., Allen PD., Kay WW. (2005). Identification and expression of a host-recognized antigen, FspA, from *Flavobacterium psychrophilum*. *Microbiology* 151(Pt 9): 3127-3135.
- D**
- Dalsgaard I. (1993). Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other Cytophaga-like bacteria pathogenic for fish. *Annual Review of Fish Diseases*: 127-144. Edited by M. Faisal & F. M. Hetrick. New York, NY: Pergamon Press.
- Dalsgaard I and Madsen L. (2000). Bacterial pathogens in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), reared at Danish freshwater farms. *Journal of Fish Diseases* 23, 199-209.
- Dalsgaard I. (2001). Selection of media for antimicrobial susceptibility testing of fish pathogenic bacteria. *Aquaculture* 196(3-4): 267-275.
- Davis, H. S. (1946). Care and diseases of trout. United States Fish and Wildlife Service Research Report 12. Washington, DC. p. 98.
- Decostere A., Lammens M., Haesebrouck F. (2000). Difficulties in experimental infection studies with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using immersion, oral and anal challenges. *Research in Veterinary Science* 69(2): 165-169.
- Decostere A., D'Haese E., Lammens M., Nelis H., Haesebrouck F. (2001). In vivo study of phagocytosis, intracellular survival and multiplication of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), spleen phagocytes. *Journal of Fish Diseases* 24(8): 481-487.
- Defoirdt T., Boon N., Sorgeloos P., Verstraete W., and Bossier P. (2007). Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent *vibriosis* in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology* 25: 472-479.
- DeFranco, A.L., M. Robertson et R.M. Locksley. 2009. *Immunité : la réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires*. Bruxelles.
- De Kinkelin-Pelletan P et Michel C. (2014). Historique de la pathologie et des développements sanitaires dans la pisciculture française. *Cahiers Agricoles* 23: 47-52.
- Del Cerro A., Marquez M, Guijarro JA. (2002a). Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Applied and environmental microbiology* 68, 5177-80.

- Del Cerro A., Mendoza M.C and Guijarro J.A (2002b). Usefulness of a TaqMan-based polymerase chain reaction assay for the detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Journal of Applied Microbiology 93, 149–156.
- Del Cerro A, Marquez I, Prieto JM, 2010. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Spain. Journal of fish disease 33, 285-291.
- De Vrese M., Stegelmann A., Richter B., Fenselau S., Laue C and Schrezenmeir J. (2001). Probiotics—compensation for lactase insufficiency^{1,2,3}. American Journal of Clinical Nutrition 73, 421s-429s
- Dorson M., Quillet E., Hollebecq MG., Torhy C., Chevassus B. (1995). Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicaemia virus and transmission of resistance by gynogenesis. Veterinary research 26 (5-6): 361-8.
- Duchaud E., Boussaha M., Loux V., Bernardet J-F., Michel C., Kerouault B., Mondot S, Nicolas P.; Bossy R., Caron C., Bessieres P., Gibrat JF., Claverol S., Dumetz F., Le Henaff, M., Benmansour A. (2007). Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Nature Biotechnology 25(7): 763-769.
- Dumetz F., Duchaud E., LaPatra S., Le Marrec C., Claverol S., Urdaci M, Le Henaff, M. (2006). A protective immune response is generated in rainbow trout by an {OmpH-like} surface antigen (P18) of *Flavobacterium psychrophilum*. Applied and Environmental Microbiology 72(7): 4845-4852.
- Dumetz F., LaPatra S., Duchaud E., Claverol S., Le Henaff, M. (2007). The *Flavobacterium psychrophilum* {OmpA}, an outer membrane glycoprotein, induces a humoral response in rainbow trout. Journal of Applied Microbiology 103(5): 1461-1470.
- Dumetz F., Duchaud E., Claverol S., Orioux N., Papillon S., Lapaillerie D., Le Henaff M. (2008). Analysis of the *Flavobacterium psychrophilum* outer-membrane subproteome and identification of new antigenic targets for vaccine by immunomics. Microbiology-Sgm 154: 1793-1801.
- Dunier, M. et A.K. Siwicki. 1993. «effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish - a review». *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 3, no 6, Nov, p. 423-438.
- Dunier, M. 1996. «Les effets des pesticides et des métaux lourds sur le système immunitaire de la carpe *Cyprinus carpio*». *Ichthyophysiol.*, vol. Acta 14, p. 9-22.

E

- Ekman E., Borjeson H., Johansson N. (1999). *Flavobacterium psychrophilum* in Baltic salmon *Salmo salar* brood fish and their offspring. Diseases of Aquatic Organisms 37(3): 159-163.
- Escaffre A., Bazin M., Bergot P. (2001). Disinfection of *Sparus aurata* eggs with glutaraldehyde. Aquaculture 9: 451-458.
- Evans DL., Leary JH., Jaso-Friedmann L. (2001). Nonspecific cytotoxic cells and innate immunity: regulation by programmed cell death. Developmental and Comparative Immunology. 25(8-9): 791-805.
- Evensen O and E. Lorenzen (1996). An immunohistochemical study of *Flexibacter psychrophilus* infection in experimentally and naturally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. Diseases of Aquatic Organisms 25(1/2): 53-61.

Evensen O and E. Lorenzen (1997). Simultaneous demonstration of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and *Flavobacterium psychrophilum* in paraffin-embedded specimens of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry by use of paired immunohistochemistry. *Diseases of Aquatic Organisms* 29(3): 227-232.

F

FAO (2012). La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture en 2012. Vue générale du secteur aquacole national français. FishstatPlus.

Ferra (2008). Aquaculture Ed. Vuibert.

Fontaine (2009). Développement de la pisciculture continentale européenne et domestication de nouvelles espèces. *Cahiers agricultures* 18, 144-147.

Fredriksen BN., Olsen Rolf H., Furevik A., Souhoka R. Gauthier D and Brudeseth B. (2013). Efficacy of a divalent and a multivalent water-in-oil formulated vaccine against a highly virulent strain of *Flavobacterium psychrophilum* after intramuscular challenge of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine* 31(15): 1994-1998.

Froystad MK., Rode M., Berg T., Gjoen T. (1998). A role for scavenger receptors in phagocytosis of protein-coated particles in rainbow trout head kidney macrophages. *Developmental and Comparative Immunology* 22, 533-549.

Fujiwara-Nagata E and Eguchi M. (2009). Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases* 32(10): 873-881.

G

Garcia C., Pozet F and Michel C. (2000). Standardization of experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum*, the agent of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry syndrome. *Diseases of Aquatic Organisms* 42(3): 191-197.

Gatesoupe FJ. (2002). Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture* 212, 347–360.

Gatesoupe FJ (2008). Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14(1-3):107-14.

George, S.G. et P.E. Olsson. 1994. «Metallothioneins as indicators of trace metal pollution». Dans *Biomonitoring of coastal waters and estuaries*, sous la dir. de K.J.M. Kramer, p. 151-178. Boca Raton: CRC Press.

Guichard B. (2004). Enquête Pathologie des poissons 2004: résultats & analyse, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Brest, France.

H

Haffray P., Rault P., Coudurier B (2004). Domestication et amélioration génétique des cheptels piscicoles français dans le cadre du SYSAAF. *INRA Productions animales* 17(3): 243-252.

Hagger, J.A., M.B. Jones, D.R.P. Leonard, R. Owen et T.S. Galloway. 2006. «Biomarkers and integrated environmental risk assessment: Are there more questions than answers?». *Integrated Environmental Assessment and Management*, vol. 2, no 4, p. 312-329.

- Hansen JD., Landis ED and Phillips RB. (2005). Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 102, 6919-6924.
- Harms CA., Kennedy-Stoskopf S., Horne WA., Fuller FJ., Tompkins WA. (2000). Cloning and sequencing hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) transforming growth factor-beta (TGF-beta), and development of a reverse transcription quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qcPCR) assay to measure TGF-beta mRNA of teleost fish. *Fish. Shellfishing. Immunology*. 10(1): 61-85.
- Håstein T, Gudding R, Evensen O. (2005) Bacterial vaccines for fish--an update of the current situation worldwide. *Developments Biologicals (Basel)* ;121:55-74.
- Henríquez-Núñez H, Evrard O, Kronvall G, Avendaño-Herrera R (2012). Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. *Aquaculture* 354-355.
- Henriksen, Maya Maria Mihályi; Kania, P. W.; Buchmann, K.; Dalsgaard, Inger (2014). Effect of hydrogen peroxide and/or *Flavobacterium psychrophilum* on the gills of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). / In: *Journal of Fish Diseases*, Vol. 38, No. 3, 2015, p. 259-270
- Hesami S., Parkma, J., MacInnes J.I., Gray JT., Gyles CL and Lumsden J.S. (2010) Antimicrobial Susceptibility of *Flavobacterium psychrophilum* Isolates from Ontario. *Journal Aquatic Animals Health* 22, 39-49.
- Hibi K., Ushio H., Fukuda H., Mitsubayashi K., Hayashi T., Ren H and Endo H. (2008). Immunomagnetic separation using carbonyl iron powder and flow cytometry for rapid detection of *Flavobacterium psychrophilum*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391(4): 1147-1152.
- Högfors E., Pullinen KR., Madetoja J., Wiklund T. (2008). Immunization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with a low molecular mass fraction isolated from *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of fish diseases* 31(12): 899-911.
- Högfors-Rönholm E, Wiklund T, (2010). Phase variation in *Flavobacterium psychrophilum*: characterization of two distinct colony phenotypes. *Diseases Aquatic Organismes* May 18;90(1):43-53. doi: 10.3354/dao02211.
- Högfors-Rönholm E, Wiklund T, (2012). *In vitro* opsonin-independent interactions between cells of smooth and rough phenotypes of *Flavobacterium psychrophilum* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) head kidney macrophages. *Microbial Pathogenesis* ; 53(5-6):214-8. DOI: 10.1016/j.micpath.2012.08.004.
- Holland, M.C.H. et J.D. Lambris. 2002. «The complement system in teleosts». *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 12, no 5, p. 399-420.
- Holt RA. (1987). *Cytophaga psychrophila*, the causative agent of bacterial coldwater disease in salmonid fish. Ph.D. Thesis. University State of Oregon. Corvallis.
- Holt RA., Amadi A., Rohovec JS and Fryer JL. (1989). Relation of water temperature to bacterial cold-water disease in coho salmon, chinook salmon, and rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health* 1(2): 94-101.
- Holt RA., Rohovec JS., Fryer JL. (1993). Bacterial Cold Water Disease. In: *Bacterial Diseases of fish* (ed. By V. Inglis, R.J. Roberts and N.R. Bromage), pp.3-23. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Huber-Lang, M., J.V. Sarma, F.S. Zetoune, D. Rittirsch, T.A. Neff, S.R. McGuire, J.D. Lambris, R.L. Warner, M.A. Flierl, L.M. Hoesel, F. Gebhard, J.G. Younger, S.M. Drouin, R.A. Wetsel et P.A. Ward. 2006. «Generation

of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway». *Nature medicine*, vol. 12, no 6, p. 682-687.

I

Iida Y and A. Mizokami. (1996). Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. *Gyobyo Kenkyu = Fish Pathology* 31(3): 157-164.

Izumi S. and Wakabayashi H (1997). Use of {PCR} to detect *Cytophaga psychrophila* from apparently healthy juvenile ayu and coho salmon eggs. *Gyobyo Kenkyu = Fish Pathology* 32(3): 169-173.

Izumi S., Aranishi F and Wakabayashi H. (2003) Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Diseases of Aquatic Organisms* 56, 207–214.

Izumi S., Fujii H and Aranishi F. (2005). Detection and identification of *Flavobacterium psychrophilum* from gill washings and benthic diatoms by PCR-based sequencing analysis. *Journal of Fish. Disease*. 28(9): 559-564.

J

Jaccard P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la société Vaudoise des sciences naturelles* 44, 223-270.

Jalabert B, Fostier A. 2010. La truite arc-en-ciel : de la biologie à l'élevage. Ouvrage Édition Lavoisier.

K

Katharios P., Aggathagelou A., Parakevopoulos S., Mylonas C. (2007). Comparison of iodine and glutaraldehyde as surface disinfectants for red porgy (*Pagrus pagrus*) and White Sea bream (*Diplodus sargus sargus*) eggs. *Aquaculture* 38: 527-536.

Kato G, Suzuki K, Sakai T, Kawakami M, Takano T, Matsuyama T, Nakayasu C. (2014). The role of a specific antibody against *Flavobacterium psychrophilum* infection in ayu sweetfish, *Plecoglossus altivelis altivelis* (Temminck & Schlegel, 1846). *Journal of Fish Diseases* ;38(1):107-12. doi: 10.1111/jfd.12258.

Kemenade, B., A. Groeneveld, B. Rens et J. Rombout. 1994. «Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*)». *Journal of Experimental Biology*, vol. 187, no 1, p. 143.

Kent L., Groff JM., Morrison JK., Yasutake WT., Holt RA. (1989). Spiral swimming behavior due to cranial and vertebral lesions associated with *Cytophaga psychrophila* infections in salmonid fishes. *Diseases of Aquatic Organisms* 6(1): 11-16.

Kim D.H., Austin B (2006). Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics, *Fish. Shellfish Immunol.* 21 513e524.

Kim J., Gomez DK, Nakai T, Park SC. (2010): Isolation and identification of bacteriophages infecting ayu *Plecoglossus altivelis altivelis* specific *Flavobacterium psychrophilum*. In: *Veterinary microbiology*. 140 (1-2), pp. 109-15.

Klaassen, C.D., J. Liu et S. Choudhuri. (1999). «METALLOTHIONEIN: An Intracellular Protein to Protect Against Cadmium Toxicity». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 39, no 1, p. 267-294.

Knight JA. (2000). Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 30, 145-158.

- Kohara M., Kasai H and Yoshimizu M (2012). Intra-Ovum infection in Salmonid Eggs Artificially Contaminated with Fish Pathogenic Bacteria: *Flavobacterium psychrophilum*, *Renibacterium salmoninarum* and *Aeromonas salmonicida*. The Japanese society of fish pathology, Fish Pathology, 47 (2), 49-55, 2012.6.
- Kohara M., Kasai H and Yoshimizu M (2013). Low possibility of intra-Ovum infection with *Flavobacterium psychrophilum* or *Renibacterium salmoninarum* in the Salmonid coelomic cavity. The Japanese society of fish pathology, Fish Pathology, 48 (3), 97-100, 2012.9.
- Kollner B., Blohm U., Kotterba G., Fischer U. (2001). A monoclonal antibody recognising a surface marker on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocytes. Fish and Shellfish. Immunology. 11(2): 127-142.
- Kollner B., Wasserrab B., Kotterba G., and Fischer U. (2002). Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)—how can environmental influences be detected?. Toxicology letters 131, 1-2, pp. 83-95.
- Komen H, Thorgaard GH (2007). Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. Aquaculture 269: 150–173.
- Korkea TL., Heikkinen J., Thompson KD., Von Wright A and Austin B. (2011). *Pseudomonas* sp. M174 inhibits the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. 2011, *Journal of applied microbiology*, 111 : 266-277.
- Korkea-aho T.L., Papadopoulou A., Heikkinen J., von Wright A., Adams A., Austin B. and Thompson K.D (2012). *Pseudomonas* M162 confers protection against rainbow trout fry syndrome by stimulating immunity. *Journal of Applied Microbiology*, Article first published online: 24 MAY 2012 DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05325.x.
- Kostaki M., Giatrakou V., Savvaidis I., Kontominas N., Michael G. (2009): Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) filets. In: Food microbiology. Elsevier Ltd 26 (5), pp. 475-82.
- Kum C, Kirkan S, Sekkin S, Akar F, Boyacioglu M (2008). Comparison of in vitro antimicrobial susceptibility in *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout fry. J Aquat Anim Health. 2008 Dec;20(4):245-51. doi: 10.1577/H07-040.1.
- Kumagai A., Takahashi K., Yamaoka S., Wakabayashi H. (1998). Ineffectiveness of iodophore treatment in disinfecting salmonid eggs carrying *Cytophaga psychrophila*. Gyoby Kenkyu = Fish Pathology 33(3): 123-128.
- Kumagai A., Yamaoka S., Takahashi K., Fukuda H., Wakabayashi H. (2000). Waterborne transmission of *Flavobacterium psychrophilum* in coho salmon eggs. Fish Pathology 35(1): 25-28.
- Kumagai A and Nawata A (2009). Mode of the Intra-ovum Infection of *Flavobacterium psychrophilum* in Salmonid Eggs. Fish Pathology, 45 (1), 31–36, 2010.3.
- Kumagai A. and Nawata A. (2010) Prevention of *Flavobacterium psychrophilum* vertical transmission by iodophor treatment of unfertilized eggs in salmonids. Fish Pathology 45, 164-168.
- Kumagai A. and Nawata A. (2011) Concentration of *Flavobacterium psychrophilum* in the Ovarian Fluid and Milt of Cultured Salmonids. Fish Pathology, 46, 116-119.

L

- Laanto E., Penttinen RK., Bamford JK., Sundberg LR. (2014). Comparing the different morphotypes of a fish pathogen—implications for key virulence factors in *Flavobacterium columnare*. BMC Microbiology 14:170.

- Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- LaFrentz BR., LaPatra S., Jones GR and Cain KD. (2003). Passive immunization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of bacterial coldwater disease and rainbow trout fry syndrome. *Journal of Fish Diseases* 26(7): 377-384.
- LaFrentz BR., LaPatra S., Jones GR and Cain KD. (2004). Protective immunity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following immunization with distinct molecular mass fractions isolated from *Flavobacterium psychrophilum*. *Diseases of Aquatic Organisms* 59(1): 17-26.
- LaFrentz BR., LaPatra S., Call E., Douglas R., Cain KD. (2008). Isolation of rifampicin resistant *Flavobacterium psychrophilum* strains and their potential as live attenuated vaccine candidates. *Vaccine* 26(44): 5582-5589.
- LaFrentz B.R., LaPatra S., Call E., Douglas R., Wiens G.D. and Cain K.D. (2011) Identification of immunogenic proteins within distinct molecular mass fractions of *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Disease* 34, 823-830.
- LaFrentz B.R., LaPatra S., Call E. and Cain K.D. (2012). Immunization of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) with a crude lipopolysaccharide extract from *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture Research*.
- Lammens M., Decostere A and Haesebrouck F. (2000). Effect of *Flavobacterium psychrophilum* strains and their metabolites on the oxidative activity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* phagocytes. *Diseases of Aquatic Organisms* 41(3): 173-179.
- Langevin C., Blanco M., Martin SA., Jouneau L., Bernardet JF., Houel A., Lunazzi A., Duchaud E., Michel C, Quillet E., Boudinot P (2012). Transcriptional responses of resistant and susceptible fish clones to the bacterial pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *PLoS one* 7(6).
- Le Boucher R, Dupont-Nivet M, Vandeputte M, Kerneis T, Goardon L, Labbé L (2012). Selection for adaptation to dietary shifts: towards sustainable breeding of carnivorous fish. *PLoS One* 7: e44898.
- Levraud J-P et Boudinot P (2009). Le système immunitaire des poissons téléostéens. *Medecine sciences* 25: 405-411.
- Leung HW. (2001) Ecotoxicology of glutaraldehyde: review of environmental fate and effects studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 26-39.
- Lin YT., Labbe R G., Shetty, and Kalidas (2004): Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Fish and Meat Systems by Use of Oregano and Cranberry Phytochemical Synergies. In: *Society*. 70 (9), p. 5672-5678.
- Lindstrom NM., Call., Douglas R., House, Marcia L., Moffitt, Christine M., Cain, Kenneth D. (2009). A Quantitative Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Filtration-Based Fluorescent Antibody Test as Potential Tools to Screen Broodstock for Infection with *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Aquatic Animal Health* 21(1): 43-56.
- Long A., Polinski MP., Call DR and Cain KD. (2012). Validation of diagnostic assays to screen broodstock for *Flavobacterium psychrophilum* infections. *Journal of fish disease* 35: 407-419.
- Long A, Call DR and Cain KD 2014. Investigation of the Link between Broodstock Infection, Vertical Transmission, and Prevalence of *Flavobacterium psychrophilum* in Eggs and Progeny of Rainbow Trout and Coho Salmon. *Journal of Aquatic Animal Health* DOI:10.1080/08997659.2014.886632 pages 66-77.

- Lorenzen E., Dalsgaard I., Fro, J., Hansen EM., Horlyck V., Korsholm H., Møllergaard S and Olesen NJ. (1991). Preliminary investigations of fry mortality syndrome in rainbow trout. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 11(2): 77-79.
- Lorenzen E and Karas N. (1992). Detection of *Flexibacter psychrophilus* by immunofluorescence in fish suffering from fry mortality syndrome. A rapid diagnostic method. Diseases of Aquatic Organisms 13(3): 231-234.
- Lorenzen E., Brudeseth BE., Wiklund T and Lorenzen N. (2010). Immersion exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry to wildtype *Flavobacterium psychrophilum* induces no mortality, but protects against later intraperitoneal challenge. Fish and Shellfish Immunology 24: 440-444.
- Lowry O., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of biological chemistry 193(1): 265-275.
- Lumsden JS., Ostland VE and Ferguson HW. (1996). Necrotic myositis in cage cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), caused by *Flexibacter psychrophilus*. Journal of Fish Diseases 19(2): 113-119.
- M**
- MacLean L., Vinogradov E., Crump EM., Perry MB and Kay W. (2001). The structure of the lipopolysaccharide O-antigen produced by *Flavobacterium psychrophilum* (259-93). European Journal of Biochemistry 268(9): 2710-2716.
- Madetoja J., Nyman P., Wiklund T. (2000). *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Diseases of Aquatic Organisms 43(1): 27-38.
- Madetoja J., Dalsgaard I., Wiklund T (2002). Occurrence of *Flavobacterium psychrophilum* in fish-farming environments. Diseases of Aquatic Organisms 52(2): 109-118.
- Madetoja J., Gravningen E., NorderhuA., Wiklund T., Lonnstrom L., Bjorkblom G., Ulukoy G., Bylund G., Syvertsen C., Gravningen K and Norderhus EA. (2006). Efficacy of injection vaccines against *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases 29(1): 9-20.
- Madsen L. and Dalsgaard I. (2000). Comparative studies of Danish *Flavobacterium psychrophilum* isolates: ribotypes, plasmid profiles, serotypes and virulence. Journal of Fish Diseases 23(3): 211-218.
- Madsen L., Møller JD., Dalsgaard I. (2005). *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), hatcheries: studies on broodstock, eggs, fry and environment. Journal of Fish Diseases 28(1): 39-47.
- Madsen L and Dalsgaard I (2008). Water recirculation and good management: potential methods to avoid disease outbreaks with *Flavobacterium psychrophilum*. Journal of Fish Diseases 2008, 31, 799–810 doi:10.1111/j.1365-2761.2008.00971.x.
- Madsen L., Bertelsen S., Dalsgaard I., Middelboe M. (2013). Dispersal and survival of *Flavobacterium psychrophilum* phages in vivo in rainbow trout and in vitro under laboratory conditions: Implications for their use in phage therapy. Applied and Environmental Microbiology 79(June): 4853-4861.
- Marancik D., Wiens P., Gregory D. (2013). A real-time polymerase chain reaction assay for identification and quantification of *Flavobacterium psychrophilum* and application to disease resistance studies in selectively bred rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. FEMS microbiology letters 339(2): 122-129.

- Marchand PA., Straus D.L., Wienke A., Pedersen L.F., and Meinelt T. (2013). Effect of water hardness on peracetic acid toxicity of zebrafish, *Danio rerio*, embryos. *Aquaculture* 21: 679-686.
- Massias B., Dumetz F., Urdaci M. C and Le Henaff M. (2004). Identification of P18, a surface protein produced by the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Applied Microbiology* 97(3): 574-580.
- Mata M and Santos Y. (2001). An improved enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from salmon and rainbow trout. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 21(5): 195-199.
- Merle C., Faure D., Urdaci M. C and Le Henaff M. (2003). Purification and characterization of a membrane glycoprotein from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Applied Microbiology* 94(6): 1120-1127.
- Messaoudi S, Manai M, Kergourlay G, Prévost H, Connil N, Chobert JM, Dousset X(2013). *Lactobacillus salivarius*: bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology* ;36(2):296-304. doi: 10.1016/j.fm.2013.05.010.
- Michel C., Antonio D and Hedrick RP. (1999). Production of viable cultures of *Flavobacterium psychrophilum* : approach and control. *Research in Microbiology* 150(5): 351-358.
- Miller N., Wilson M., Bengten E., Stuge T., Warr G., Clem W. (1998). Functional and molecular characterization of teleost leukocytes. *Immunol. Rev.* 166: 187-197.
- Misaka N., Nishizawa T., Yoshimizu M. (2008). Quantitative Detection of Viable *Flavobacterium psychrophilum* in Chum Salmon *Oncorhynchus keta* by Colony Blotting and Immunostaining. *Fish Pathology* 43(3): 117-123.
- Mitchell AJ., Radomski AA., Straus DL. and Carter R. (2009). The effect of hydrogen peroxide on the hatch rate and *Saprolegnia* spp. infestation of channel catfish eggs. *North American Journal of Aquaculture* 71, 276-280.
- Moller JD., Larsen JL., Madsen L and Dalsgaard I. (2003). Involvement of a sialic acid-binding lectin with hemagglutination and hydrophobicity of *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and environmental microbiology* 69: 5275-5280.

N

- Navarrete P., Toledo I., Mardones P., Opazo R., Espejo R. and Romero J. (2010) Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. *Aquaculture Research*, 41, 667-678.
- Neissi A., Rafiee G., Nematollahi M., Safari O (2013). The effect of *Pediococcus acidilactici* bacteria used as probiotic supplement on the growth and non-specific immune responses of green terror, *Aequidens rivulatus*, *Fish Shell- fish Immunol.* 35 1976e1980.
- Nematollahi A., Decostere A., Pasmans F., Ducatelle R and Haesebrouck F. (2003). Adhesion of high and low virulence *Flavobacterium psychrophilum* strains to isolated gill arches of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms* 55(2): 101-107.
- Nilsen, H; Sundell, K; Duchaud, E; Nicolas, P; Dalsgaard, I; Madsen, L; Aspán, A; Jansson, E; Colquhoun, D J.; Wiklund, T (2014). Multilocus Sequence Typing Identifies Epidemic Clones of *Flavobacterium psychrophilum* in Nordic Countries. In: *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 80, No. 9, 2014, p. 2728-2736.

- Nikoskelainen S., Verho S., Jarvinen S., Madetoja J., Wiklund T., Lilius EM. (2007). Multiple whole bacterial antigens in polyvalent vaccine may result in inhibition of specific responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology* 22(3): 206-217.
- Nupur B., Srinivas TN., Kumar PA. (2013). *Flavobacterium nitratireducens* sp. nov., an amylolytic bacterium of the family *Flavobacteriaceae* isolated from coastal surface seawater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2490-2496.

O

- Obach A and Laurencin FB. (1991). Vaccination of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) against the visceral form of coldwater disease. *Diseases of Aquatic Organisms* 12(1): 13-15.
- Okamoto N, Tayama T, Kawanobe M, Fujiki N, Yasuda Y, Sano T (1993). Resistance of a rainbow trout strain to infectious pancreatic necrosis. *Aquaculture* 117: 71–76.
- Onuk E E., Ciftci A., Findick A and Durmaz Y. (2010). "Development and evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Flavobacterium psychrophilum*, *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* in culture fisheries." *Journal of Veterinary Science* 11(3): 235-241.
- Orieux N., Bourdineaud JP., Douet DG., Daniel P., Le Henaff M. (2011). Quantification of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), tissues by qPCR. *Journal of fish diseases* 34(11): 811-821.
- Orieux N, Douet DG, Le Hénaff M, Bourdineaud JP (2013). Prevalence of *Flavobacterium psychrophilum* bacterial cells in farmed rainbow trout: characterization of metallothionein A and interleukin1- β genes as markers overexpressed in spleen and kidney of diseased fish. *Vet Microbiol.* 2013 Feb 22;162 (1):127-35. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.08.015. Epub 2012 Aug 29.
- Oplinger RW, Wagner EJ (2013). Control of *Flavobacterium psychrophilum* : tests of erythromycin, streptomycin, osmotic and thermal shocks, and rapid pH change. *Journal of Aquatic Animal Health.* Mar;25(1):1-8. doi: 10.1080/08997659.2012.720636.
- Ostland VE., McGrogan DG., Ferguson HW. (1997). Cephalic osteochondritis and necrotic scleritis in intensively reared salmonids associated with *Flexibacter psychrophilus*. *Journal of Fish Diseases* 20(6): 443-451.
- Ostrand SL., Glenn RA., Gannam AL and Hanson KC. (2012) Inhibitory effects of rosemary oil on the in vitro growth of six common finfish pathogens. *North American Journal of Aquaculture*, 74, 230-234.
- Overturf K, LaPatra S (2006). Quantitative expression (Walbaum) of immunological factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after infection with either *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromonas salmonicida*, or infectious haematopoietic necrosis virus. *Journal of Fish Disease* (4):215-24.

P

- Panigrahi A., Kiron V., Satoh S., Hirano I., Kobayashi T., Sugita H (2007). Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding, *Dev. Comp. Immunol.* 31 372e382.
- Pearson W. (1990). Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology* 183: 63-98.
- Pfaffl M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9): 45.

- Phillippy A., Ayanbule K., Edwards NJ., Salzberg SL. (2009). Insignia: a DNA signature search web server for diagnostic assay development. *Nucleic Acids Research* 10(37): 229-234.
- Picón-Camacho SM., Marco.-Lopez M., Beljean A., Debeaume S., Shinn AP. (2012). "In vitro assessment of the chemotherapeutic action of a specific hydrogen peroxide, peracetic, acetic, and peroctanoic acid-based formulation against the free-living stages of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora)." *Parasitology research* 110: 1029-1032.
- Plant KP., LaPatra SE., Cain KD. (2009). Vaccination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with recombinant and {DNA} vaccines produced to *Flavobacterium psychrophilum* heat shock proteins 60 and 70. *Journal of Fish Diseases* 32(6): 521-534.
- Plant KP, Lapatra SE, Call DR, Cain KD (2011). Immunization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum), with *Flavobacterium psychrophilum* proteins elongation factor-Tu, SufB Fe-S assembly protein and ATP synthase β . *Journal of Fish Diseases* ;34(3):247-50. doi: 10.1111/j.1365-2761.2010.01235.x.
- Plant KP, LaPatra SE, Call DR, Cain KD (2014). Attempts at validating a recombinant *Flavobacterium psychrophilum* gliding motility protein N as a vaccine candidate in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) against bacterial cold-water disease. *FEMS Microbiology Letters* ;358(1):14-20. doi: 10.1111/1574-6968.12543.
- Pottinger TG. and Day JG. (1999) A *Saprolegnia parasitica* challenge system, for rainbow trout: assessment of *Pyceze* as an anti-fungal agent for both fish and ova. *Diseases of Aquatic Organisms* 36, 129-141.
- Pottinger TG (2010). A multivariate comparison of the stress response in three salmonid and three cyprinid species: evidence for inter-family differences. *Journal of fish biology* 76: 601–21.
- Pyrgotou N., Giatrakou V., Ntzimani A., Savvaidis IN. (2010): Quality assessment of salted, modified atmosphere packaged rainbow trout under treatment with oregano essential oil. In: *Journal of food science*. 75 (7), p. M406-11.
- Q**
- Qi, Z.-H., Y.-F. Liu, W.-N. Wang, X. Wu, Y. Xin, Y.-F. Lu et A.-L. Wang. 2011. «Molecular characterization and functional analysis of a complement C3 molecule in the orange- spotted grouper (*Epinephelus coioides*)». *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 31, no 6, p. 1284-1290.
- Quillet E (2002). Mutation in a Sex-Determining Gene in Rainbow Trout: Detection and Genetic Analysis. *Journal of Heredity* 93: 91–99.
- Quillet E, Le Guillou S, Aubin J, Fauconneau B (2005). Two-way selection for muscle lipid content in pan-size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 245: 49–61.
- Quillet E, Boudry P, Lapegue S (2007). Genetic variability of response to pathogens: a tool to improve health of farmed fish and molluscs. *Production Animales* 20: 239–251.
- R**
- Rahman H., Kuroda A., Dijkstra JM., Kiryu I., Nakanishi T., Ototake M., Rahman MH. (2002). The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. *Fish & shellfish immunology* 12(2): 169-179.
- Rahman MH., Ototake M., Nakanishi T. (2003). Water-soluble adjuvants enhance the protective effect of *Flavobacterium psychrophilum* vaccines in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Gyobyo Kenkyu = Fish Pathology* 38(4): 171-176.

- Randrianarivelo R., Danthu P., Benoit C., Ruez P., Raherimandimby M., Sarter S. (2010): Novel alternative to antibiotics in shrimp hatchery: effects of the essential oil of *Cinnamosma fragrans* on survival and bacterial concentration of *Penaeus monodon* larvae. In: Journal of applied microbiology. 109 (2), pp. 642-50.
- Rangdale RE and Way K. (1995). Rapid identification of *Cytophaga psychrophila* from infected spleen tissue using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 17, 108-111.
- Rangdale RE., Richards RH., Alderman DJ. (1997). Colonisation of eyed rainbow trout ova with *Flavobacterium psychrophilum* leads to rainbow trout fry syndrome in fry. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 17: 108-111.
- Reynaud, S. et P. Deschaux. 2006. «The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review». *Aquatic Toxicology*, vol. 77, no 2, May, p. 229- 238.
- Rexroad CE, Lee Y, Keele JW, Karamycheva S, Brown G, Koop B (2003). Sequence analysis of a rainbow trout cDNA library and creation of a gene index. *Cytogenetic and genome research* 102: 347–54.
- Rhodes RG, Nelson SS, Pochiraju S, McBride MJ (2011). *Flavobacterium johnsoniae* sprB is part of an operon spanning the additional gliding motility genes sprC, sprD, and sprF. *Journal of Bacteriology*. (3):599-610. doi: 10.1128/JB.01203-10.
- Ringo E, Gatesoupe Fj (1998). Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160(3-4), 177-203. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00299-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00299-8).
- Rollo A., Sulpizio R., Nardi M., Silvi S., Orpianesi C., Caggiano M., Cresci A and Carnavali O. (2006). Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. *Fish Physiology and Biochemistry* 32: 167-177.
- Romano, N., M.R. Baldassini, F. Buonocore, S. Picchietti, L. Mastrolia et L. Abelli. 2005. «In vivo allograft rejection in a bony fish *Dicentrarchus labrax* (L.): characterisation of effector lymphocytes». *Cell and Tissue Research*, vol. 321, no 3, p. 353-363.
- Rozen S. and Skaletsky H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132: 365-386.
- Ryumae U., Hibi K., Yoshiura Y., Ren H., Endo H. (2010). Rapid and highly sensitive detection of *Flavobacterium psychrophilum* using high gradient immunomagnetic separation with flow cytometry. *Aquaculture* 309(1-4): 125-130.

S

- Sakai M, Yoshida T., Astuta S., Kobayashi M., (1995). Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) by oral administration of *Clostridium butyricum* bacteria. *Journal of Fish Diseases* 18 (1995) 187-190.
- Sanchez-Dardon, J., I. Voccia, A. Hontela, S. Chilmonczyk, M. Dunier, H. Boermans, B. Blakley et M. Fournier. 1999. «Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vivo». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, no 7, Jul, p. 1492-1497.

- Santos Y., Huntly PG., Turnbull A., Hastings TS (1992). Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) in association with rainbow trout mortality in the United Kingdom. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 12: 209-210.
- Sato K, Naito M, Yukitake H, Hirakawa H, Shoji M, McBride MJ, Rhodes RG, Nakayama K. (2010). A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A ; 107(1):276-81. doi: 10.1073/pnas.0912010107.
- Secombes CJ., Hardie LJ and Daniels G (1996). Cytokines in fish : An update. Shellfish Immunology 6: 291-304.
- Secombes CJ., Wang T., Hong S., Peddie S., Crampe M., Laing K. J., Cunningham C., Zou J (2001). Cytokines and innate immunity of fish. Developmental and Comparative. Immunology. 25(8-9): 713-723.
- Shah SQ, Nilsen H, Bottolfson K, Colquhoun DJ, Sørum H (2012). DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in quinolone-resistant *Flavobacterium psychrophilum* isolated from diseased salmonids in Norway. Microb Drug Resist. 2012 Apr;18(2):207-14. doi: 10.1089/mdr.2011.0142. Epub 2012 Jan 27.
- Sharifuzzaman S.M., Austin B (2009). Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout, Fish. Shellfish Immunol. 27 440e445.
- Siekoula Y (2012). Etude de la variabilité génétique de *Flavobacterium psychrophilum*, pathogène de salmonidés. Thèse de doctorat. Université de Nantes.
- Siekoula-Nguedia C, Blanc G, Duchaud E, Calvez S. (2012). Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout in France: predominance of a clonal complex. Veterinary Microbiology, 161(1-2):169-78.
- Skouras, A., K. Broeg, H. Dizer, H. von Westernhagen, P.D. Hansen et D. Steinhagen. 2003. The use of innate immune responses as biomarkers in a programme of integrated biological effects monitoring on flounder (*Platichthys flesus*) from the southern North Sea. Helgoland Marine Research, vol. 57, no 3-4, Oct, p. 190-198.
- Starliper CE. (2011). Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. Journal of Advanced Research 2, 97–108.
- Stenholm AR., Dalsgaard I., Middelboe M. (2008). Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Applied and Environmental Microbiology 74(13): 4070-4078.
- Straus DL., Meinelt T., Farmer BD., Mitchell AJ. (2012). Peracetic acid is effective for controlling fungus on channel catfish eggs. 35 505-511.
- Strepparava N., Wahli T., Segner H., Polli B., Petrini O. (2012) Fluorescent *in situ* Hybridization: a new tool for the direct identification and detection of *F. psychrophilum*. PLoS One 7(11): e49280. doi:10.1371/journal.pone.0049280.
- Strepparava N, Nicolas P, Wahli T, Segner H, Petrini O (2013). Molecular epidemiology of *Flavobacterium psychrophilum* from Swiss fish farms. Dis Aquat Organ. 2013 Sep 3;105(3):203-10. doi: 10.3354/dao02609.
- Strepparava N., Wahli T., Segner H and Petrini O. (2014) Detection and quantification of *Flavobacterium psychrophilum* in water and fish tissue samples by quantitative real time PCR. BMC Microbiology, 14:105

Subramanian S, MacKinnon SL, Ross NW (2007). A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochem Mol Biol* 2007 ; 148 : 256-63.6.

Sun Z, Wang B, Liu Y, Liu X, Mi Y, Gu M, Wang F, Wu C, Hu C. (2015) Genome organization and transcriptional regulation of Adenosine Deaminase Acting on RNA gene 1 (ADAR1) in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Developmental and Comparative Immunology* (2):98-105. doi: 10.1016/j.dci.2015.02.006.

Suzuki K., Arai H., Kuge T., Katagiri T., Izumi S. (2008). Reliability of PCR Methods for the Detection of *Flavobacterium psychrophilum*. *Fish Pathology* 43(3): 124-127.

Sunyer, J.O., L. Tort et J.D. Lambris. 1997. «Structural C3 diversity in fish: characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*». *The Journal of Immunology*, vol. 158, no 6, March 15, 1997, p. 2813-2821.

T

Thomas-Jinu S. and Goodwin AE. (2004) Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque): Efficacy of practical treatments for warm water aquaculture ponds. *Journal of Fish Diseases* 27, 23–28.

Tine M, Kuhl H, Beck A, Bargelloni L, Reinhardt R. (2011). Comparative analysis of intronless genes in teleost fish genomes: insights into their evolution and molecular function. *Mar Genomics*. (2):109-19. doi: 10.1016/j.margen.2011.03.004.

Touchon M, Barbier P, Bernardet J-F, Loux V, Vacherie B, Barbe V, Rocha E. P. C., and Duchaud E. (2011). "Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium branchiophilum*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, no. 21, pp. 7656–62.

Toyama T., KitaTsukamoto K and Wakabayashi H. (1996). Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. *Fish pathology*. 31: 25-31.

U

Ultee A., Bennik MHJ and Moezelaar R. (2002): The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. In: *Society*. 68 (4), p. 1561-1568.

Urdaci MC., Chakroun C., Faure D., Bernardet JF. (1998). Development of a polymerase chain reaction assay for identification and detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Research in Microbiology* 149(7): 519-530.

V

Valdebenito S, Avendano- Herrera R, 2009. Phenotypic, serological and genetic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated from salmonids in Chile. *Journal of fish disease* 32, 321-333.

Valenzuela A, Campos V, Yañez F, Alveal K, Gutiérrez P, Rivas M, Contreras N, Klempau A, Fernandez I, Oyarzun C (2012). Application of artificial photoperiod in fish: a factor that increases susceptibility to infectious diseases? *Fish Physiology and Biochemistry*, Volume 38, Issue 4, pp 943-950.

Vallejo RL., Wiens GD., Rexroad CE., Welch TJ., Evenhuis JP., Leeds TD., Janss† LLG and Palti Y (2010). Evidence of major genes affecting resistance to bacterial cold water disease in rainbow trout using Bayesian methods of segregation analysis. *Journal Animal Science* doi:10.2527/jas.2010-2951.

- Vallejo R, Palti Y, Liu S, Evenhuis JP, Gao G, Rexroad CE and Wiens GD (2014). Detection of QTL in Rainbow Trout Affecting Survival When Challenged with *Flavobacterium psychrophilum*. *Marine Biotechnology* 11/2013; 16(3). DOI: 10.1007/s10126-013-9553-9.
- Van der Oost, R., J. Beyer et N.P.E. Vermeulen(2003). «Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review». *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 13, no 2, Feb, p. 57-149.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3(7).
- Vatsos IN., Thompson KD., Adams A. (2001). Adhesion of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* to unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and n-hexadecane. *Letters in Applied Microbiology* 33(3): 178-182.
- Vatsos IN., Thompson KD., Adams A. (2006). Colonization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), eggs by *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of rainbow trout fry syndrome." *Journal of Fish Diseases* 29(7): 441-444.
- W**
- Wagner EJ., Oplinger RW., Arndt RE., Forest AM., Bartley M. (2010). The safety and effectiveness of various hydrogen peroxide and iodine treatment regimens for rainbow trout egg disinfection. 72: 24-42.
- Wagner EJ., Oplinger RW. and Bartley M. (2012). Laboratory and production scale disinfection of salmonid eggs with hydrogen peroxide. *North American Journal Aquaculture* 74, 92-99.
- Wagner EJ. and Randall W. (2013). Toxicity of copper sulfate to *Flavobacterium psychrophilum* and rainbow trout eggs. *Journal of Aquatic Animal Health* 25, 125-130.
- Watts M. B., Burke CM. (2001). Immune responses of teleost fish. *Australian veterinary journal* 79(8): 570-574.
- WHO antimicrobial resistance fact sheet 2002:
<http://www.keepantibioticsworking.com/library/UploadedFiles/ABR-UCS-fact-sheet.pdf>.
- Wiens GD, LaPatra SE, Welch TJ, Evenhuis JP, Rexroad III CE, Leeds TD (2013a). On-farm performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selectively bred for resistance to bacterial cold water disease: Effect of rearing environment on survival phenotype. *Aquaculture* 388–391 (2013) 128–136 <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.018>.
- Wiens GD, Vallejo RL, Leeds TD, Palti Y, Hadidi S, et al. (2013b). Assessment of Genetic Correlation between Bacterial Cold Water Disease Resistance and Spleen Index in a Domesticated Population of Rainbow Trout: Identification of QTL on Chromosome Omy19. *PLoS ONE* 8(10): e75749. doi:10.1371/journal.pone.0075749.
- Wiens GD, LaPatra SE, Welch TJ, Rexroad C, Call DR, Cain KD, LaFrentz BR, Vaisvil B, Schmitt DP, Kapatral V. (2014). Complete Genome Sequence of *Flavobacterium psychrophilum* Strain CSF259-93, Used To Select Rainbow Trout for Increased Genetic Resistance against Bacterial Cold Water Disease. *Genome Announcements* 18 (2) : 5.
- Wiklund T., Madsen L., Bruun MS., Dalsgaard, I. (2000). Detection of *Flavobacterium psychrophilum* from fish tissue and water samples by {PCR} amplification. *Journal of Applied Microbiology* 88(2): 299-307
- Woese CR., Stackebrandt E., Macke TJ., Fox GE. (1985). A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Systematic and Applied Microbiology* 6, 143-151.

- Wood EM. and Yasutake WT. (1956). Histopathology of kidney disease in fish. American Journal of Pathology. 32(4): 845-857.
- Wood JW. (1974). Disease of pacific salmon, their prevention and treatment, 2nd ed.
- Wu AK, Kropinski AM, Lumsden JS, Dixon B, MacInnes JI(2015). Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* ATCC 49418(T.).Standards in Genomic Sciences21;10:3. doi: 10.1186/1944-3277-10-3. eCollection.

Y

- Yeh RY., Shiu YL., Shei SC., Cheng SC., Huang SY., Lin JC., Liu CH. (2009): Evaluation of the antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinnamomum kanehirae*, and the effects on immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. In: Fish and shellfish immunology. 27 (1), p. 26-32.
- Yue GH, Lo LC, Zhu ZY, Lin G, Feng F. (2006) The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of *Tetraodon nigroviridis*.DNA Seq. 2006 Apr;17(2):115-21.

Z

- Zapata AG. (1983). Phylogeny of the fish immune system. Bulletin de l'Institut Pasteur 81, 165-186.
- Zapata AG and Cooper EL. (1990). The Immune System : Comparative Histophysiology. John Wiley and Sons, Chichester.
- Zapata AG., Torroba M., Vicente A., Varas A., Sacedón R. (1996). Structure of the lymphoid organs of elasmobranchs. Journal of Experimental Zoology 275, 125-143.

Contribution à une approche intégrée pour la prévention de la flavobactériose dans les élevages de truites arc-en-ciel.

Flavobacterium psychrophilum est le pathogène de la maladie de l'eau froide ou du syndrome de l'alevin qui provoque des pertes économiques importantes dans les élevages de truite arc-en-ciel en Aquitaine. Au cours de cette thèse, nous avons développé dans un premier temps un nouveau test qPCR TaqMan en duplex qui cible les gènes (i) *adnr16S* de *F. psychrophilum* et (ii) β -actine de la truite arc-en-ciel ; il permet de déterminer le taux d'infection de tissus contaminés au cours d'une même analyse.

Dans un second temps, nous avons cherché à objectiver trois approches préventives qui pourraient être mises en œuvre pour limiter l'infection à *F. psychrophilum* dans les élevages. La caractérisation de biocides classiquement utilisés par la filière aquacole a permis de proposer aux aquaculteurs des méthodes de désinfection réellement efficaces contre *F. psychrophilum* mais qui n'affectent pas le développement des œufs ni des futurs alevins. En parallèle, l'impact de la mise en place de traitement probiotiques a été caractérisé à la surface des œufs, à la surface du mucus et/ou le long du système digestif, dès les tout premiers stades de développement des truites, sur le nombre et l'intensité des crises de flavobactériose dans les élevages. Deux traitements microbiens ont été retenus : l'E112[®] (DOXAL-FRANCE, Pessac) et le Bactocell[®] (LALLEMAND, Toulouse). Enfin, trois préparations vaccinales ont été préparées (« Adjuvant », « Autovaccin » et « Membrane Externe ») et testées pour leur capacité à protéger les poissons de la flavobactériose.

Mots clefs : *Flavobacterium psychrophilum*, *Oncorhynchus mykiss*, aquaculture

Contributing to an integrated approach for the prevention of flavobacteriosis in farmed rainbow trout.

Flavobacterium psychrophilum is the causative agent of cold water disease or the rainbow trout fry syndrome which causes important economic losses in rainbow trout breedings. During this thesis, we firstly developed a new duplex Taqman qPCR test which targets the following genes (i) *F. psychrophilum adnr16S* and (ii) rainbow trout β -actine. This test enables to obtain the infection rate of contaminated tissues, during a same analysis.

Then, we tried to objectivize three preventive approaches which could be implemented in breedings to limit the infection by *F. psychrophilum*. The characterization of biocides used in aquaculture allowed proposing to the fish farmers effective methods of disinfection against *F. psychrophilum*. These methods do not affect the development of eggs or future fish larva. Moreover, the impact of the implementation of probiotics on the surface of eggs, on the surface of the mucus and/or the digestive system, from the very first steps of trout development has been characterized on the number and the intensity of flavobacteriosis outbreaks in the breeding farms. Two probiotic treatments were selected: l'E112[®] (DOXAL-FRANCE, Pessac) and Bactocell[®] (LALLEMAND, Toulouse). Finally, three vaccine preparations (« Adjuvant », « Auto-vaccine » and « Outer Membrane ») were prepared and tested for their capability to protect farmed fish against flavobacteriosis.

Key words: *Flavobacterium psychrophilum*, *Oncorhynchus mykiss*, aquaculture

EPOC « Environnement et Paléoenvironnement Océaniques & Continentaux »

[Université de Bordeaux, UMR CNRS 5805, 351 Cours de la Libération, Talence]